

Family list

7 family members for:

JP2001288256

Derived from 5 applications.

- 1 Polyhydroxy alkanoate and process for producing them with microbe**
Publication info: **CN1322768 A** - 2001-11-21
- 2 Polyhydroxyalkanoates and method of producing them by utilizing microorganisms**
Publication info: **EP1118629 A2** - 2001-07-25
EP1118629 A3 - 2004-01-14
- 3 POLYHYDROXYALKANOATE AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME BY USING MICROORGANISM**
Publication info: **JP2001288256 A** - 2001-10-16
- 4 Polyhydroxyalkanoates and method of producing them by utilizing microorganisms**
Publication info: **US6521429 B2** - 2003-02-18
US2001029039 A1 - 2001-10-11
- 5 Process for producing polyhydroxyalkanoates by utilizing microorganisms**
Publication info: **US2003180899 A1** - 2003-09-25

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide**BEST AVAILABLE COPY**

BEST AVAILABLE COPY

POLYHYDROXYALKANOATE AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME BY USING MICROORGANISM

Patent number: JP2001288256
Publication date: 2001-10-16
Inventor: YANO TETSUYA; IMAMURA TAKESHI; HONMA TSUTOMU; KENMOKU TAKASHI; SUDA SAKAE; KOBAYASHI TOYOKO; KOBAYASHI TATSU
Applicant: CANON KK
Classification:
- international: C08G63/06; C12N1/20; C12P7/62; C12N1/20; C12R1/38; C12N1/20; C12R1/40; C12P7/62; C12R1/38; C12P7/62; C12R1/40
- european: C08G63/06; C08G63/682B; C08G63/685B; C12P7/62A
Application number: JP20000361323 20001128
Priority number(s): JP19990371864 19991227; JP19990371867 19991227; JP19990371868 19991227; JP19990371869 19991227; JP20000023024 20000131; JP20000023025 20000131; JP20000361323 20001128

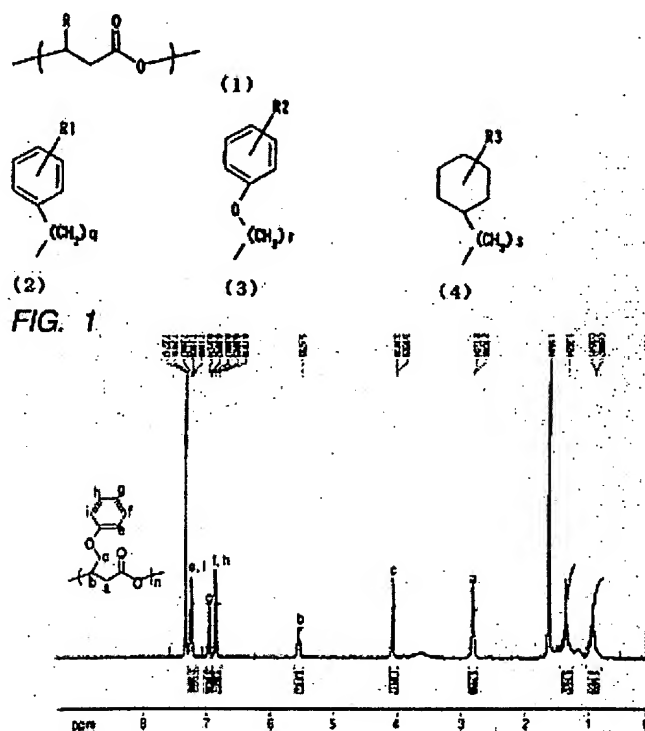
Also published as:

EP1118629 (A2)
 US6521429 (B2)
 US2001029039 (A1)
 EP1118629 (A3)

Report a data error here

Abstract of JP2001288256

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a polyhydroxyalkanoate (PHA) comprising units of a variously structured monomer having a substituents as a side chain and being useful as a device material, a medical material, or the like and a method for producing PHA by using microorganisms. **SOLUTION:** An ω -substituted linear alkanolic acid which is substituted with one six-membered atomic group selected from a substituted or unsubstituted phenyl group, a substituted or unsubstituted phenoxy group, and a substituted cyclohexyl group at a molecular terminal is used as a starting material used in a culture medium, and microorganisms are cultured in the medium to produce a polyhydroxyalkanoate comprising units derived from a monomer being the corresponding ω -substituted-3-hydroxy-alkanoic acid.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-288256

(P2001-288256A)

(43) 公開日 平成13年10月16日 (2001. 10. 16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	特開2001-288256 (参考)
C 0 8 G 63/06	Z B P	C 0 8 G 63/06	Z B P 4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/20	Z N A	C 1 2 N 1/20	Z N A D 4 B 0 6 6
C 1 2 P 7/62		C 1 2 P 7/62	4 J 0 2 9
// (C 1 2 N 1/20		(C 1 2 N 1/20	D
C 1 2 R 1:38)		C 1 2 R 1:38)	
審査請求 未請求 請求項の数26 O L (全 81 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-361323 (P2000-361323)	(71) 出願人	000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(22) 出願日	平成12年11月28日 (2000. 11. 28)	(72) 発明者	矢野 哲哉 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ ノン株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願平11-371864	(72) 発明者	今村 剛士 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ ノン株式会社内
(32) 優先日	平成11年12月27日 (1999. 12. 27)	(74) 代理人	100088328 弁理士 金田 暢之 (外2名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願平11-371867		
(32) 優先日	平成11年12月27日 (1999. 12. 27)		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願平11-371868		
(32) 優先日	平成11年12月27日 (1999. 12. 27)		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ポリヒドロキシアルカノエートおよび微生物を利用するその製造方法

(57) 【要約】

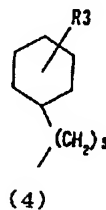
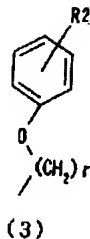
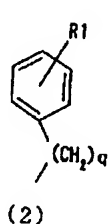
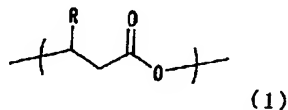
【課題】 デバイス材料や医療用材料等として有用な置換基を側鎖に有する多様な構造のモノマーユニットを含むPHAの提供、ならびに、当該PHAを微生物を利用して製造する方法の提供。

【解決手段】 微生物を用いて、鎖の末端に、置換または未置換フェニル基、置換または未置換フェノキシ基、置換または未置換シクロヘキシル基の何れかの6員環原子団が置換されている、 ω -置換-直鎖アルカン酸を原料として、対応する ω -置換-3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(1)で示されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアリカノエート。

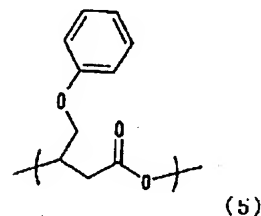
【化1】



(式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択される；式(3)中、R2は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、rは、1~8の整数から選択される；式(4)中、R3は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、sは、1~8の整数から選択される；但し、上記一般式(1)におけるRとして、一種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=2の基、R1=Hでq=3の基、式(3)において、R2=ハロゲン原子でr=2の基、R2=-CNでr=3の基、R2=-NO₂でr=3の基、は、選択肢からは除外され、二種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=3及び5の二種の基の組み合わせ、式(3)において、R2=Hでr=1及び3の二種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2及び4の二種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2及び6の二種の基の組み合わせ、R2=ハロゲン原子でr=2及び4の二種の基の組み合わせ、は、選択肢からは除外され、三種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=3、5及び7の三種の基の組み合わせ、式(3)において、R2=Hでr=1、3及び5の三種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2、4及び6の三種の基の組み合わせ、は、選択肢からは除外される)

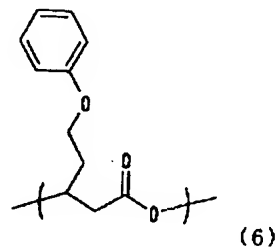
【請求項2】 下記式(5)で示される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸ユニットからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアリカノエート

【化3】



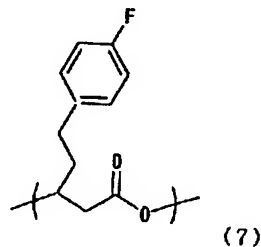
【請求項3】 下記式(6)で示される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ユニットからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアリカノエート。

【化4】



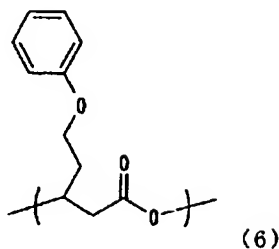
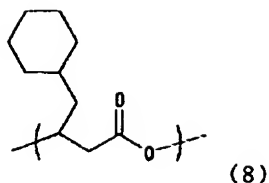
【請求項4】 下記式(7)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸ユニットからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアリカノエート。

【化5】

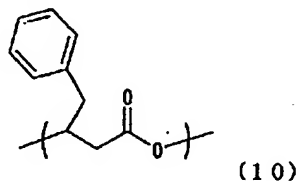


【請求項5】 下記式(8)で示される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアリカノエート。

【化6】

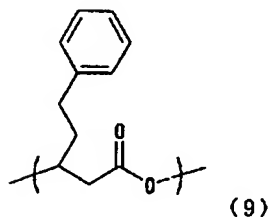


【請求項7】 下記式(10)で示される3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸ユニットと下記式(11)で示される3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸ユニット



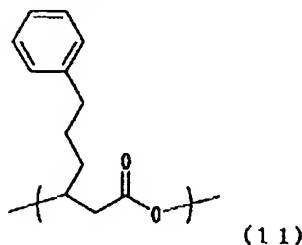
【請求項6】 下記式(6)で示される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ユニットと下記式(9)で示される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットとからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアлкоノエート。

【化7】



とからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアлкоノエート。

【化8】

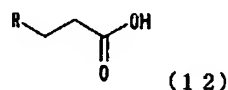


【請求項8】 数平均分子量が、1万～20万である請求項1～7のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアлкоノエート。

【請求項9】 ポリヒドロキシアлкоノエートの製造方法であって、原料とするアルカノエートと酵母エキスを含有培地で、前記アルカノエートを利用して前記ポリヒドロキシアлкоノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とするポリヒドロキシアлкоノエートの製造方法。

【請求項10】 原料とする前記アルカノエートが下記一般式(12)で表されるアルカノエートであり、目的産物である前記ポリヒドロキシアлкоノエートが下記式(13)で表されるモノマーユニットを有するポリヒドロキシアлкоノエートであることを特徴とする請求項9に記載のポリヒドロキシアлкоノエートの製造方法。

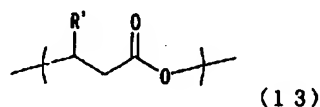
【化9】



(式(12)中、Rは、下記一般式(2)、一般式(3)、あるいは一般式(4)のいずれかで示される基

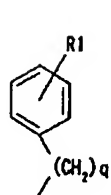
から選択される少なくとも1つ以上の基である)

【化10】

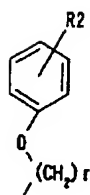


(式(13)中、R'は、上記式(12)においてRとして選択された基、ならびに、このRとして選択された基が、下記式(2)で示され、 $q = q_0$ の基である場合、対応するR1を有し、 $q = q_0 - 2$ 、 $q = q_0 - 4$ 、あるいは $q = q_0 - 6$ の基、下記式(3)で示され、 $r = r_0$ の基である場合、対応するR2を有し、 $r = r_0 - 2$ 、 $q = r_0 - 4$ 、あるいは $r = r_0 - 6$ の基、下記式(4)で示され、 $s = s_0$ の基である場合、対応するR3を有し、 $s = s_0 - 2$ 、 $s = s_0 - 4$ 、あるいは $s = s_0 - 6$ の基、から選択される少なくとも1つ以上の基である。なお、 $q_0 - 2$ 、 $r_0 - 2$ あるいは $s_0 - 2$ 、 $q_0 - 4$ 、 $r_0 - 4$ あるいは $s_0 - 4$ 、 $q_0 - 6$ 、 $r_0 - 6$ あるいは $s_0 - 6$ は、1以上の整数値のみを取り得る)

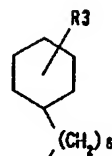
【化11】



(2)



(3)



(4)

【式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{F}_5$ 、 $-\text{C}_3\text{F}_7$ から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択される；式

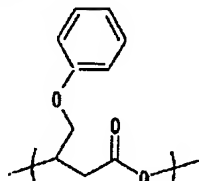
(3)中、R2は、水素原子(H)、ハロゲン原子、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{F}_5$ 、 $-\text{C}_3\text{F}_7$ から選択される基であり、rは、1~8の整数から選択される；式(4)

中、R3は、水素原子(H)、ハロゲン原子、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{F}_5$ 、 $-\text{C}_3\text{F}_7$ から選択される基であり、sは、1~8の整数から選択される)

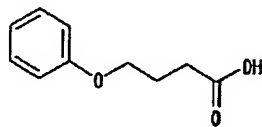
【請求項11】 下記式(5)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、

下記式(14)で表される4-フェノキシ酪酸と酵母エキスを含有培地で、4-フェノキシ酪酸を利用してポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化12】



(5)



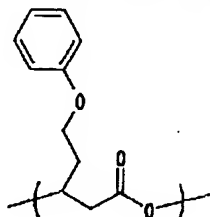
(14)

【請求項12】 下記式(6)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、

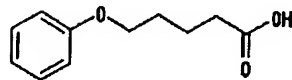
下記式(15)で表される5-フェノキシ吉草酸と酵母エキスを含有培地で、5-フェノキシ吉草酸を利用し

てポリ-3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化13】



(6)



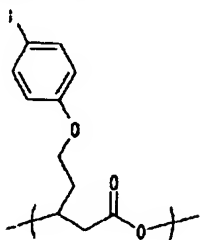
(15)

【請求項13】 下記式(16)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、

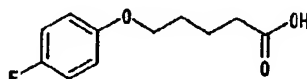
下記式(17)で表される5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸と酵母エキスを含有培地で、5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸を利用してポリ-3-ヒドロ

キシ-5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化14】



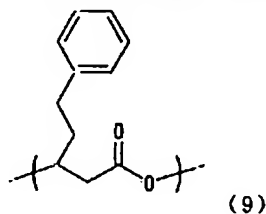
(16)



(17)

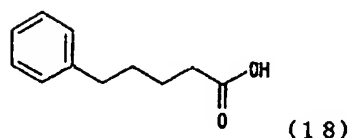
【請求項14】 下記式(9)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、

下記式(18)で表される5-フェニル吉草酸と酵母エキスとを含む培地で、5-フェニル吉草酸を利用してポ



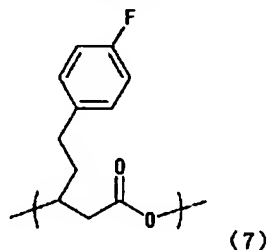
リ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化15】



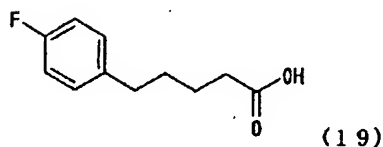
【請求項15】 下記式(7)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、

下記式(19)で表される5-(4-フルオロフェニル)吉草酸と酵母エキスとを含む培地で、5-(4-フ



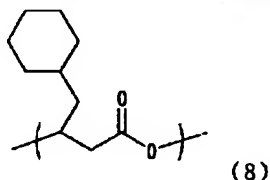
ルオロフェニル)吉草酸を利用してポリ-3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化16】



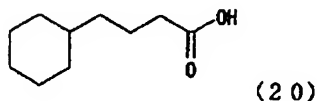
【請求項16】 下記式(8)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、

下記式(20)で表される4-シクロヘキシル酪酸と酵母エキスとを含む培地で、4-シクロヘキシル酪酸を利



用してポリ-3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化17】

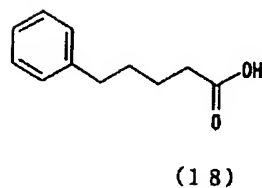
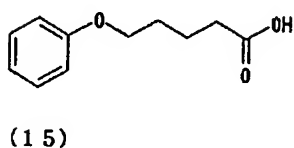
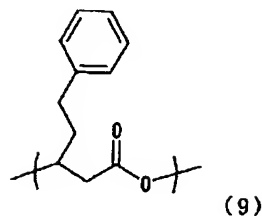
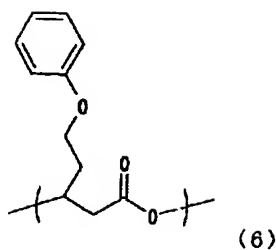


【請求項17】 下記式(6)で表されるモノマーユニットと下記式(9)で表されるモノマーユニットとからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、

下記式(15)で表される5-フェノキシ吉草酸及び下記式(18)で表される5-フェニル吉草酸と酵母エキスとを含む培地で、5-フェノキシ吉草酸及び5-フェ

ニル吉草酸を利用して、それぞれ3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸からなるポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化18】

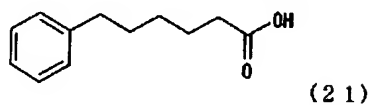
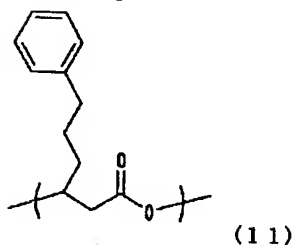
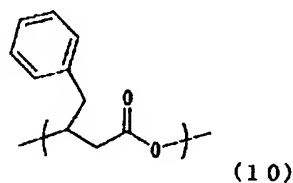


【請求項18】 下記式(10)で表されるモノマーユニット及び下記式(11)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、

下記式(21)で表される6-フェニルヘキサン酸と酵母エキスを含む培地で、6-フェニルヘキサン酸を利

用して3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸及び3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸からなるポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化19】

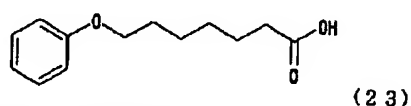
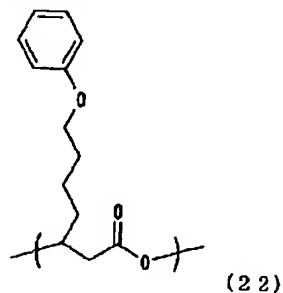
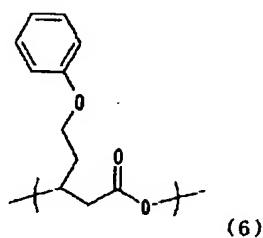


【請求項19】 下記式(6)で表されるモノマーユニット及び下記式(22)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、

下記式(23)で表される7-フェノキシヘプタン酸と酵母エキスを含む培地で、7-フェノキシヘプタン酸

を利用して3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸からなるポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化20】



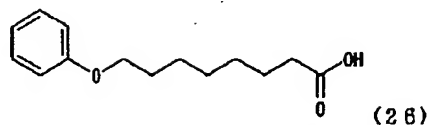
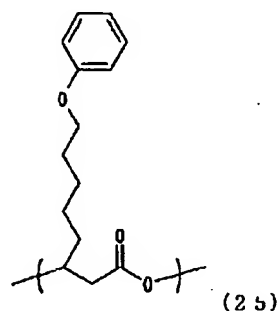
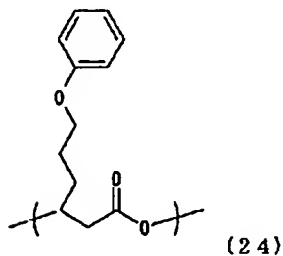
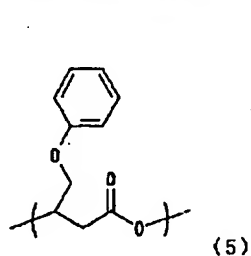
【請求項20】 下記式(5)で表されるモノマーユ

ット、下記式(24)で表されるモノマーユニット及び

下記式(25)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、
 下記式(26)で表される8-フェノキシオクタン酸と酵母エキスを含む培地で、8-フェノキシオクタン酸を利用して3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸及び3-ヒドロ

キシ-8-フェノキシオクタン酸からなるポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

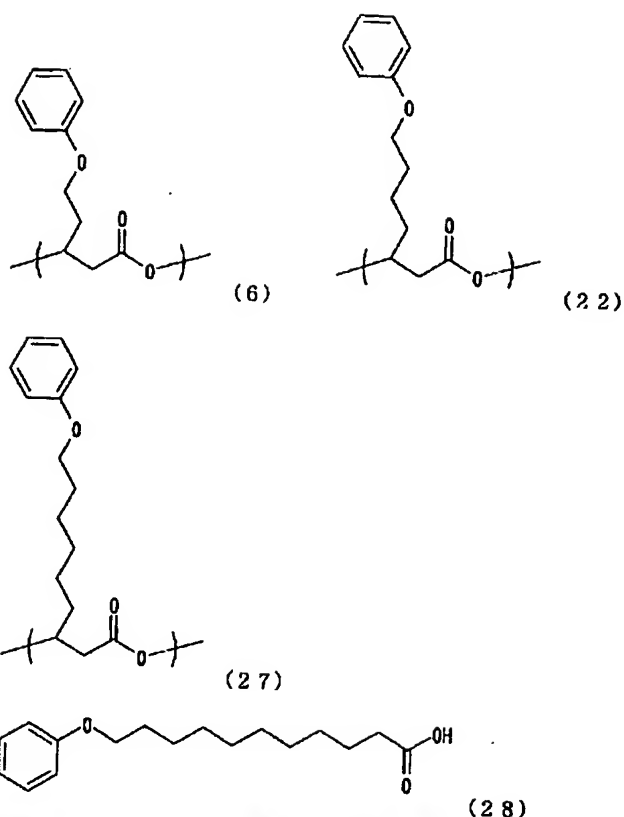
【化21】



【請求項21】 下記式(6)で表されるモノマーユニット、下記式(22)で表されるモノマーユニット及び下記式(27)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、
 下記式(28)で表される11-フェノキシウンデカン酸と酵母エキスを含む培地で、11-フェノキシウンデカン酸を利用して3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉

草酸、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸からなるポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化22】



【請求項22】 微生物の培養が、アルカノエートと酵母エキスをを含む培地による一段階で行われる請求項9に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項23】 微生物の培養が、アルカノエートと酵母エキスをを含む培地による培養と、これに続く、アルカノエートを含有窒素源を制限した培地による培養の二段階で行われる請求項9に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項24】 ポリヒドロキシアルカノエートの分離／精製工程を有する請求項9に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項25】 微生物が、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) に属する微生物である請求項9に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項26】 シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) に属する微生物が、シュードモナス・チコリアイ・YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2, FERM P-17411)、シュードモナス・チコリアイ・H45株 (*Pseudomonas cichorii* H45, FERM P-17410)、シュードモナス・プチダ・P91株 (*Pseudomonas putida* P91, FERM P-17409)、シュードモナス・ジェッセニイ・P161株 (*Pseudomonas jessenii* P161, FERM P-17445) からなる群から選択される少なくとも1株であることを特徴とする請求

項25記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なポリヒドロキシアルカノエート (PHA) ならびに、微生物を利用してかかる新規なPHAを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】長年にわたって、石油由来の合成高分子をプラスチック等として利用してきたが、使用後廃棄されるこれらプラスチック等の処理が大きな社会問題となっている。石油由来の合成高分子は、分解されにくい利点から金属材料、ガラス等の代替えを果たしてきたが、大量に消費され、また大量に廃棄される昨今では、その分解されにくいという性質が逆に災いし廃棄物処理場に蓄積されることとなった。また、焼却処理を行うとCO₂排出量の増加となり、ある場合には、ダイオキシンや環境ホルモン等の有害物質の発生原因ともなる。

【0003】一方、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) に代表される微生物産生ポリエステル (PHA) は、従来のプラスチックと同様、溶融加工等により各種製品の生産に利用することができるとともに、石油由来の合成高分子とは異なり、生物により分解されうるといった特性を有している。従って、廃棄した際、微生物産生ポリエステルは生分解されることにより、自然界の物質循環に取り込まれるので、従来利用されていた、多くの

合成高分子化合物のように自然環境に残留して汚染を引き起こすことがない。また、生分解処理を行うことで、燃焼処理を行う必要もないため、大気汚染や地球温暖化を防止するという観点でも有効な材料であり、環境保全を可能とするプラスチックとして利用することができる。加えて、微生物産生ポリエステルに対しては、医療用軟質部材への応用なども検討されている（特開平5-159号公報、特開平6-169980号公報、特開平6-169988号公報、特開平6-225921号公報など）。

【0004】これまで、多くの微生物がPHBあるいはその他のPHAを生産し、菌体内に蓄積することが報告されている（「生分解性プラスチックハンドブック」、生分解性プラスチック研究会編、（株）エヌ・ティー・エス発行、P178-197、1995）。このような微生物産生PHAは、その生産に用いる微生物の種類や培地組成、培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることが知られており、これまで主に、PHAの物性の改良という観点から、産生されるPHAの組成や構造の制御に関する研究がなされてきた。

【0005】例えば、アルカリゲネス・ユウトロファス H16株（*Alcaligenes eutropus* H16、ATCC No. 17699）及びその変異株は、その培養時の炭素源を変化させることによって、3-ヒドロキシ酪酸（3HB）と3-ヒドロキシ吉草酸（3HV）との共重合体を様々な組成比で生産することが報告されている（特表平6-15604号公報、特表平7-14352号公報、特表平8-19227号公報等）。

【0006】また、特許公報第2642937号では、シュドモナス・オレオボランス・ATCC29347株（*Pseudomonas oleovorans* ATCC29347）に、炭素源として非環状脂肪族炭化水素を与えることにより、炭素数が6から12までの3-ヒドロキシアルカノエートのモノマーユニットを有するPHAが生産されることが開示されている。

【0007】特開平5-74492号公報では、メチロバクテリウム属（*Methylobacterium* sp.）、パラコッカス属（*Paracoccus* sp.）、アルカリゲネス属（*Alcaligenes* sp.）、シュドモナス属（*Pseudomonas* sp.）の微生物を、炭素数3から7の第一アルコールに接触させることにより、3HBと3HVとの共重合体を生産させる方法が開示されている。

【0008】特開平5-93049号公報、及び、特開平7-265065号公報では、アエロモナス・キャビエ（*Aeromonas caviae*）を、オレイン酸やオリーブ油を炭素源として培養することにより、3HBと3-ヒドロキシヘキサノ酸（3HHx）の2成分共重合体が生産されることが開示されている。

【0009】特開平9-191893号公報では、コマナス・アシドボランス・IFO13852株（*Comamonas acidovorans* IFO13852）が、グルコン酸及び1,4-ブタンジオールを炭素源として用いた培養により、3HBと4-ヒドロキシ酪酸とをモノマーユニットとして持つポリエステルを生産することが開示されている。

【0010】さらに、ある種の微生物では、様々な置換基、例えば、不飽和炭化水素から得られる基、エステル基、アリル基、シアノ基、ニトロ基、ハロゲン化炭化水素から得られる基、エポキシド等が導入されたPHAを生産することが報告されており、このような手法によって微生物産生PHAの物性改良を目指す試みもなされ始めている。これら置換基が導入された微生物産生ポリエステルの事例は、FEMS Microbiology Letters, 128 (1995) p219-228に詳細に記載されているが、例えば、Makromol. Chem., 191, 1957-1965, 1990, Macromolecules, 24, 5256-5260, 1991, Chirality, 3, 492-494, 1991等では、シュドモナス・オレオボランスが3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸（3HPV）モノマーユニットを含むPHAを生産することが報告されており、3HPVモノマーユニットが含まれることに起因すると考えられる、ポリマー物性の変化が認められている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】以上のように、微生物産生PHAにおいては、その製造に用いる微生物の種類や培地組成、培養条件等を変えることにより、各種の組成・構造のものが得られているが、プラスチックとしての応用を考えた場合、物性的に未だ十分であるとは言えない。微生物産生PHAの利用範囲をさらに拡大していくためには、物性の改良をより幅広く検討していくことが重要であり、そのためにはさらに多様な構造のモノマーユニットを含むPHAと、その製造方法、ならびに所望のPHAを効率的に生産しうる微生物の開発、探索が必須である。

【0012】一方、前述のような、置換基を側鎖に導入したタイプのPHAは、導入した置換基を所望とする特性等に応じて選択することで、導入した置換基の特性等に起因する、極めて有用な機能や特性を具備した「機能性ポリマー」としての展開も期待できる。すなわち、そのような機能性と生分解性とを両立可能であるような優れたPHAと、その製造方法、ならびに、所望のPHAを効率的に生産しうる微生物の開発、探索もまた重要な課題である。

【0013】このような置換基を側鎖に導入したPHAの例としては、フェノキシ基を側鎖に有するPHAが挙げられる。

【0014】例えば、Macromol. Chem. Phys., 195, 1665-1672 (1994)には、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が11-フェノキシウンデカン酸から3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0015】また、Macromolecules, 29, 3432-3435 (1996)には、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) を用いて、6-フェノキシヘキサン酸から3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸及び3-ヒ

ドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸をユニットとして含むPHAを、8-フェノキシオクタン酸から3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸及び3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸及び3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸をユニットとして含むPHAを、11-フェノキシウンデカン酸から3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。この報告におけるポリマーの収率を抜粋すると以下のとおりである。

【0016】

【表1】

炭素源 (アルカノエート)	乾燥菌体重量 (mg/l)	乾燥ポリマー重量 (mg/l)	収率 (%)
6-フェノキシヘキサン酸	850	100	10.5
8-フェノキシオクタン酸	820	90	11
11-フェノキシウンデカン酸	150	15	10

【0017】更に、Can. J. Microbiol., 41, 32-43 (1995)では、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) ATCC 29347株及びシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) KT2442株を用いて、オクタン酸とp-シアノフェノキシヘキサン酸或いはp-ニトロフェノキシヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-p-シアノフェノキシヘキサン酸或いは3-ヒドロキシ-p-ニトロフェノキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含むPHAの生産に成功している。

【0018】特許第2989175号公報には、3-ヒドロキシ-5- (モノフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (MFP) P) ユニットあるいは3-ヒドロキシ-5- (ジフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (DFP) P) ユニットからなるホモポリマー、少なくとも3H5 (MFP) Pユニットあるいは3H5 (DFP) Pユニットを含有するコポリマー；これらのポリマーを合成するシュードモナス・プチダ；シュードモナス属を用いた前記のポリマーの製造方法が記載されている。

【0019】これらの生産は以下の様な「二段階培養」で行われている。

培養時間：一段目、24時間；二段目、96時間

各段における基質と得られるポリマーを以下に示す。

(1) 得られるポリマー：3H5 (MFP) Pホモポリマー

一段目の基質：クエン酸、イーストエキス

二段目の基質：モノフルオロフェノキシウンデカン酸

(2) 得られるポリマー：3H5 (DFP) Pホモポリマー

一段目の基質：クエン酸、イーストエキス

二段目の基質：ジフルオロフェノキシウンデカン酸

(3) 得られるポリマー：3H5 (MFP) Pコポリマー

一段目の基質：オクタン酸あるいはノナン酸、イーストエキス

二段目の基質：モノフルオロフェノキシウンデカン酸

(4) 得られるポリマー：3H5 (DFP) Pコポリマー

一段目の基質：オクタン酸あるいはノナン酸、イーストエキス

二段目の基質：ジフルオロフェノキシウンデカン酸

その効果としては、置換基をもつ中鎖脂肪酸を資化して、鎖末端が1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、融点が高く良い加工性を保ちながら、立体規則性、親水性を与えることができるとしている。

【0020】また、シクロヘキシル基をモノマーユニット中に含むPHAは、通常の脂肪酸ヒドロキシアルカン酸をユニットとして含むPHAとは異なる高分子物性を示すことが期待されており、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) による生産の例が報告されている (Macromolecules, 30, 1611-1615 (1997))。

【0021】この報告によれば、シュードモナス・オレオボランスを、ノナン酸 (以下、NAと記載する) と4-シクロヘキシル酪酸 (以下、CHBAと記載する) あるいは5-シクロヘキシル吉草酸 (以下、CHVAと記載する) の共存する培地中で培養すると、シクロヘキシル基を含むユニットと、ノナン酸由来のユニットを含むPHAが得られている (各割合は不明)。

【0022】その収率等に関しては、CHBAに対し

て、基質濃度トータル20 mMの条件で、CHBAとNAの量比を変化させ、表2に示すような結果を得たと報告されている。

【0023】
【表2】

NA:CHBA	CDW	PDW	収率	ユニット
5:5	756.0	89.1	11.8	NA, CHBA
1:9	132.8	19.3	14.5	NA, CHBA

【0024】CDW:乾燥菌体重量 (mg/L)、
PDW:乾燥ポリマー重量 (mg/L)、
収率:PDW/CDW (%)

しかしながら、この例では、培養液当たりのポリマー収率は十分なものではなく、また、得られたPHA自体も、そのモノマーユニット中にはノナン酸由来の脂肪族ヒドロキシアルカン酸が混在しているものである。

【0025】このように、様々な置換基を側鎖に導入したPHAを微生物により製造しようとする場合、先に挙げたシュードモナス・オレオボランスの報告例等に見られるように、導入しようとする置換基を有するアルカノエートを、ポリマー原料としての利用に加えて増殖用炭素源としても利用する方法が用いられている。

【0026】しかしながら、導入しようとする置換基を有するアルカノエートを、ポリマー原料としての利用に加えて増殖用炭素源としても利用する方法は、当該アルカノエートからのβ酸化によるアセチル-CoAの生成に基づく炭素源及びエネルギー源の供給を期待されており、このような方法においては、ある程度の鎖長を有する基質でないとβ酸化によりアセチル-CoAを生成することができず、このためPHAの基質として用いるアルカノエートが限定されてしまう点が大きな課題である。また、一般的に、β酸化により鎖長がメチレン鎖2つずつ短くなった基質が新たに生成し、これらがPHAのモノマーユニットとして取り込まれるため、合成されるPHAは鎖長がメチレン鎖2つずつ異なるモノマーユニットからなる共重合体となることが多い。前述の報告例では、基質である8-フェノキシオクタン酸由来の3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸と、代謝産物由来の副生物である3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸及び3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸の3種類のモノマーユニットからなる共重合体が生産される。この点で、単一のモノマーユニットからなるPHAを得ようとする場合、この方法を用いることは極めて難しい。さらに、β酸化によるアセチル-CoAの生成に基づいた炭素源及びエネルギー源の供給を前提とした方法では、微生物の増殖が遅く、PHAの合成に時間がかかる点、合成されたPHAの収率が低くなりがちな点も大きな課題である。

【0027】このため、導入しようとする置換基を有するアルカノエートに加えて、増殖用炭素源として、オクタン酸やノナン酸といった中鎖の脂肪酸等を共存させた培地で微生物を培養したのち、PHAを抽出する方法が

有効と考えられ、一般的に用いられている。

【0028】しかしながら、前記の方法で生産されたPHAには、導入しようとする置換基を有するモノマーユニットと、増殖用炭素源に由来するモノマーユニット（例えば、3-ヒドロキシオクタン酸や3-ヒドロキシノナン酸等）とが混在する。これらの中鎖長 (mc l: medium chain length) -モノマーユニットは、単独の組成においては常温で粘着性のポリマーであり、本発明の目的とするPHAに混在した場合、ポリマーのガラス転移温度 (Tg) を著しく降下させる。このため、常温で硬いポリマー物性を得ようとする場合、mc l-モノマーユニットの混在は望ましくない。また、このようなヘテロな側鎖構造は分子内あるいは分子間での側鎖構造に由来する相互作用を妨害し、結晶性あるいは配向性に大きな影響を与えることが知られている。ポリマー物性の向上、機能性の付与を達成するにあたり、これらのmc l-モノマーユニットの混在は大きな課題である。この課題の解決手段としては、特定の置換基を有するモノマーユニットのみで構成されたPHAを取得するために、増殖用炭素源由来のmc l-モノマーユニット等の「目的外」のモノマーユニットを分離/除去するための精製工程を設けることが挙げられる。しかしながら、操作が煩雑となる上、収率の大幅な低下も避けられない点が課題となる。さらに大きな問題点は、目的のモノマーユニットと目的外のモノマーユニットとが共重合体を形成している場合、目的外のモノマーユニットのみを除去するのは極めて困難な点である。特に、不飽和炭化水素から得られる基、エステル基、アリール基、シアノ基、ニトロ基、ハロゲン化炭化水素から得られる基、エポキシ基等が導入された基を側鎖構造として有するようなモノマーユニットを含むPHAの合成を目的とする場合、mc l-モノマーユニットは目的のモノマーユニットと共重合体を形成する 경우가多く、PHA合成後のmc l-モノマーユニット除去は極めて困難である。

【0029】本発明は前記の課題を解決するものであり、本発明の目的は、デバイス材料や医療用材料等として有用な置換基を側鎖に有する多様な構造のモノマーユニットを含むPHAの提供、ならびに、当該PHAを微生物を利用して製造する方法の提供、特に、目的外のモノマーユニットの混在が少なく、しかも高収率な製造方法を提供することにある。さらには、目的外のモノマーユニットの混在がなく、所望のモノマーユニットのみで構成される新規なPHAの提供、ならびに、当該PH

Aを微生物を利用して製造する方法を提供することにある。

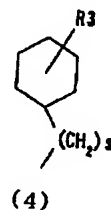
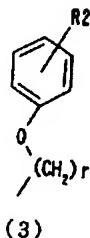
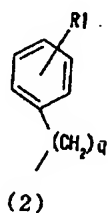
【0030】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記の課題を解決すべく、特に、デバイス材料や医療用材料等として有用な、置換あるいは無置換のフェノキシ基、フェニル基及びシクロヘキシル基を側鎖上に有するPHAの開発を目指して、PHAを生産し、菌体内に蓄積する能力を有する新規な微生物の探索、ならびに、新規な微生物を用いて、所望のPHAを製造する方法について、鋭意研究を進めた。

【0031】さらに、目的外のモノマーユニットの混在をなくし、効率的に所望とするPHAを得られる方法を開発すべく、鋭意研究・検討を重ねてきた結果、微生物を培養する際、対応する原子団を有する原料のアルカノエートに加え、酵母エキスを添加した培地で微生物の培養を行うことによって、目的外のモノマーユニットを混在させることなく所望とするPHAのみを選択的に生産できること、あるいは目的外のモノマーユニットの混在を少なくできることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0032】すなわち、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法は、目的とするポリヒドロキシアルカノエートを製造する際、原料とするアルカノエートと酵母エキスを含有する培地で、前記アルカノエートを利用して前記ポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。かかる本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法は、より具体的に記載すると下記する形態で実施されるものである。

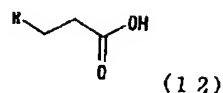
【0033】すなわち、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法における第一の形態は、下記式(12)：



【0039】(式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択される；式(3)中、R2は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、rは、1~8の整数から選択される；式(4)中、R3は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、sは、1~8の整数から選択される)で表される

【0034】

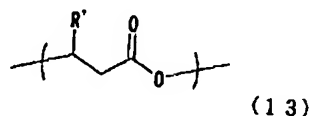
【化23】



【0035】(式(12)中、Rは、下記一般式(2)、一般式(3)、あるいは一般式(4)のいずれかで示される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)で表されるアルカノエートと酵母エキスを含有する培地で微生物を培養し、微生物菌体からポリヒドロキシアルカノエートを抽出して、下記式(13)：

【0036】

【化24】



【0037】(式(13)中、R'は、上記式(12)においてRとして選択された基、ならびに、このRとして選択された基が、下記式(2)で示され、q=q₀の基である場合、対応するR1を有し、q=q₀-2、q=q₀-4、あるいはq=q₀-6の基、下記式(3)で示され、r=r₀の基である場合、対応するR2を有し、r=r₀-2、q=r₀-4、あるいはr=r₀-6の基、下記式(4)で示され、s=s₀の基である場合、対応するR3を有し、s=s₀-2、s=s₀-4、あるいはs=s₀-6の基、から選択される少なくとも1つ以上の基である。なお、q₀-2、r₀-2あるいはs₀-2、q₀-4、r₀-4あるいはs₀-4、q₀-6、r₀-6あるいはs₀-6は、1以上の整数値のみを取り得る)

【0038】

【化25】

モノマーユニットを有するポリヒドロキシアルカノエートを取得することを特徴とする製造方法である。特に、上記一般式(13)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートを取得することを特徴とする製造方法である。

【0040】この方法においては、原料となる式(12)で表されるアルカノエートを一種類とし、対応するモノマーユニット、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットをも含む、PHAを製造

することができる。また、上述するように、原料となる式(12)で表されるアルカノエートは培養時に複数種を用いることもでき、その際には、生成されるポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数を用いることが好ましい。一般には、式(12)で表されるアルカノエートを5種類程度まで原料に用いることで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、5種類以上の多くの種類の原料を利用することも可能である。例えば、上記の一般式(2)、一般式(3)ならびに一般式(4)の三種をいずれをも含み、それぞれ3種類程度までを選択し、合計して、5種類を超える原料を用いることも可能である。

【0041】また、一般式(2)におけるベンゼン環上の置換基R1、ならびに一般式(3)におけるベンゼン環上の置換基R2は、オルト位(2位または6位)、メタ位(3位または5位)ならびにパラ位(4位)のいずれを選択することも可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換ベンゼン環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に応じて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、ベンゼン環上パラ位(4位)に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと遜色なく、より好適に用いることができる。同じく、一般式(4)のシクロヘキシル環上、R3の置換位置は、1位、2位(または6位)、3位(または5位)ならびに4位のいずれを選択することも可能であり、加えて、cis配置とtrans配置のどちらをも選択可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換シクロヘキシル環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に応じて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、シクロヘキシル環上4位に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと遜色なく、より好適に用いることができる。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、R-体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソタクチックなポリマーである。その結果、かかる方法で生産されるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

【0042】本発明の方法において、微生物の培養は、式(12)のアルカノエートと酵母エキスを含有する培地で一旦培養した後、培養された菌体を、当該アルカノエートを含み、窒素源を制限した培地においてさらに培養する、二段階の培養とすることができる。また、微生物

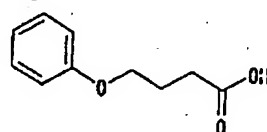
の培養を、式(12)のアルカノエートと酵母エキスを含有する培地のみで行う一段階の培養とすることもできる。加えて、利用する微生物を、シュードモナス属(*Pseudomonas* sp.)に属する微生物から選択すると好ましい。好適に利用可能なシュードモナス属(*Pseudomonas* sp.)に属する菌株として、例えば、シュードモナス チコリアイ・YN2株(*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM P-17411)、シュードモナス・チコリアイ・H45株(*Pseudomonas cichorii* H45, FERM P-17410)、シュードモナス・アチダ・P91株(*Pseudomonas putida* P91, FERM P-17409)、シュードモナス・ジェッセニイ・P161株(*Pseudomonas jessenii* P161, FERM P-17445)を挙げることができ、前記4種の菌株のいずれかを選択するとより好ましい。

【0043】以下に、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法における第一の形態における、好ましい発明の態様を個別的に、より具体的に記載する。

【0044】本発明者らは、下記式(14)：

【0045】

【化26】

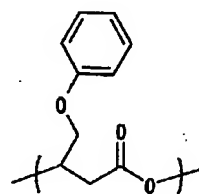


(14)

【0046】で表される4-フェノキシ酪酸(PxB)と酵母エキスを含有する培地で培養することで、下記式(5)：

【0047】

【化27】



(5)

【0048】で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)モノマーユニットからなるポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(PHPxB)ホモポリマーを製造し得る微生物を得ることに成功した。

【0049】すなわち、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法による、前記第一の形態に含まれる、一つの態様は、上記式(14)で表されるPxBと酵母エキスを含有する培地で、PxBを利用して上記式(5)で示される3HPxBモノマーユニットの繰返し単位からなるPHPxBホモポリマーを生産する微生物

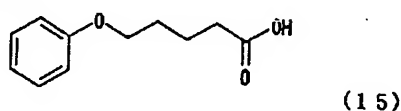
物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0050】これまでにPxBAを基質とした、3HPxBをモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産の報告例はなく、また、PHPxBのホモポリマーであるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例もない。従って、上記方法で得られるPHPxBは新規であり、本発明が提供する新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

【0051】本発明者らは、また、下記式(15)：

【0052】

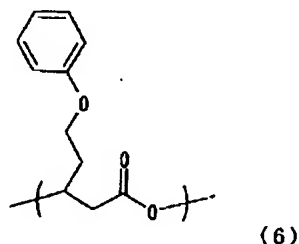
【化28】



【0053】で表される5-フェノキシ吉草酸(PxVA)と酵母エキスをを含む培地で培養することで、下記式(6)：

【0054】

【化29】



【0055】で表される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)モノマーユニットからなるホモポリマーを製造し得る微生物を得ることに成功した。

【0056】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(15)で表されるPxVAと酵母エキスをを含む培地で、PxVAを利用して上記式(6)で示される3HPxVモノマーユニットの繰返し単位からなるポリ-3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(PHPxV)ホモポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

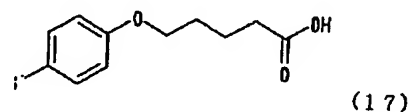
【0057】これまでにPxVAを基質とした、3HPxVをモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産の報告例はなく、また、PHPxVのホモポリマーであるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例もない。従って、上記方法で得られるPHPxVは新規であり、本発明が提供する

新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

【0058】本発明者らは、また、下記式(17)：

【0059】

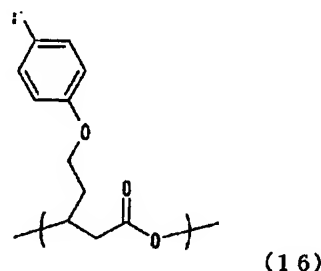
【化30】



【0060】で表される5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸(FPxVA)と酵母エキスをを含む培地で培養することで下記式(16)：

【0061】

【化31】



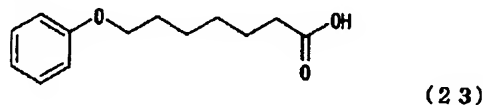
【0062】で表される3-ヒドロキシ-5-(フルオロフェノキシ)吉草酸(3HF PxV)モノマーユニットからなるホモポリマーを製造し得る微生物を得ることに成功した。

【0063】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(17)で表されるFPxVAと酵母エキスをを含む培地で、FPxVAを利用して上記式(16)で示される3HF PxVモノマーユニットの繰返し単位からなるポリ-3-ヒドロキシ-5-(フルオロフェノキシ)吉草酸(PHP PxV)ホモポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0064】本発明者らは、また、下記式(23)：

【0065】

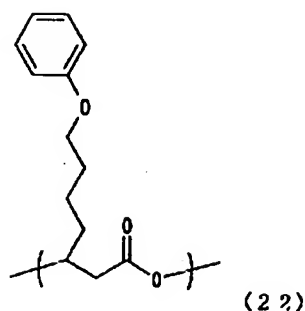
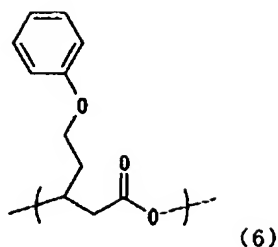
【化32】



【0066】で表される7-フェノキシヘプタン酸(PxHpA)と酵母エキスをを含む培地で培養することで下記式(6)及び(22)：

【0067】

【化33】



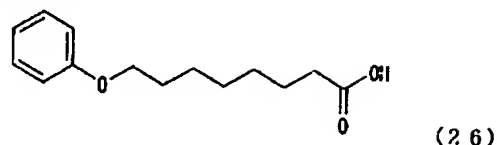
【0068】で表される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) 及び3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) ユニットからなるコポリマーを生産できる微生物を微生物を得ることに成功した。

【0069】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式 (23) で表されるPxHpAと酵母エキスをを含む培地で、PxHpAを利用して上記式 (6) 及び (22) で示される3HPxV及び3HPxHpモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートコポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0070】本発明者らは、また、下記式 (26) :

【0071】

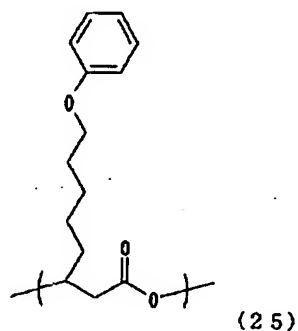
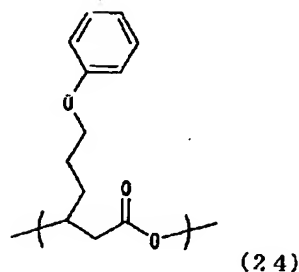
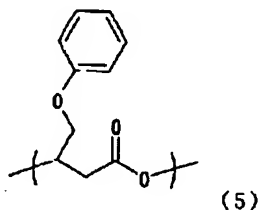
【化34】



【0072】で表される8-フェノキシオクタン酸 (PxOA) と酵母エキスをを含む培地で培養することで上記式 (5)、(24) 及び (25) :

【0073】

【化35】



【0074】で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸 (3HPxB)、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸 (3HPxHx) 及び3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸 (3HPxO) ユニットからなるコポリマーを生産できる微生物を得ることに成功した。

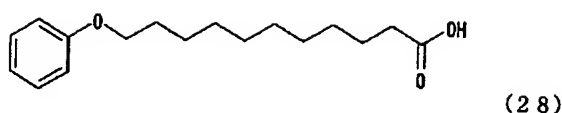
【0075】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式 (26) で表されるPxOAと酵母エキスをを含む培地で、PxOAを利用して上記

式 (5)、(24) 及び (25) で示される3HPxB、3HPxHx及び3HPxOモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートコポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0076】本発明者らは、また、下記式 (28) :

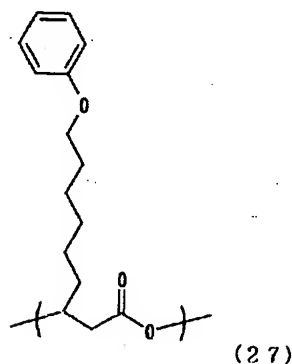
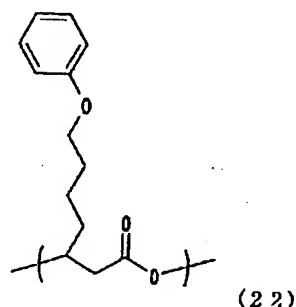
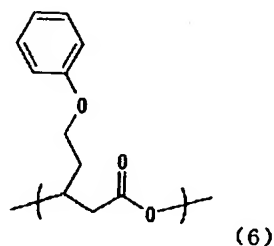
【0077】

【化36】



【0078】で表される11-フェノキシウンデカン酸 (PxUDA) と酵母エキスを含有する培地で培養することによって下記式(6)、(22)及び(27)：

【0079】
【化37】



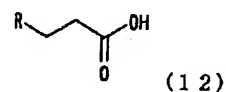
【0080】で表される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HPxHp)及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸(3HPxN)ユニットからなるコポリマーを生産できる微生物を得ることに成功した。

【0081】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(28)で表されるPxUDAと酵母エキスを含有する培地で、PxUDAを利用して上記式(6)、(22)及び(27)で示される3HPxV、3HPxHp及び3HPxNモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートコポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0082】さらには、上記の一連の態様に詳述した方法に加えて、フェノキシ基を有する側鎖を所望とする基で置換した下記式(12)のアルカノエートをモノマー成分の原料として、対応する種々の側鎖を有するポリヒドロキシアルカノエートを、微生物を利用して選択的に生産することができる。原料として、かかる下記式(12)のアルカノエートを利用し、下記式(13)で示されるモノマーユニット組成を有するポリヒドロキシアル

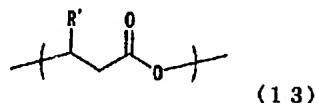
カノエートの製造方法も、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法による、前記第一の形態に含まれる。

【0083】
【化38】



【0084】(式(12)中、Rは、下記一般式(3)で表される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)

【0085】
【化39】

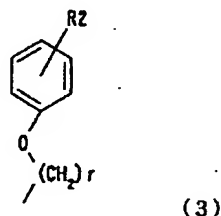


【0086】(式(13)中、R'は、上記式(12)においてRとして選択された基、ならびに、このRとして選択された基が、下記式(3)で示され、 $r=r_0$ の基である場合、対応するR2を有し、 $r=r_0-2$ 、 $q=r_0-4$ 、あるいは $r=r_0-6$ の基、から選択される

少なくとも1つ以上の基である。なお、 r_0-2 、 r_0-4 あるいは r_0-6 は、1以上の整数値のみを取り得る)

【0087】

【化40】



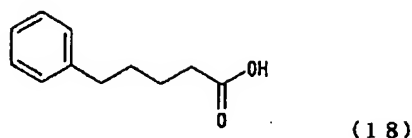
【0088】(式(3)中、R2は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、rは、1~8の整数から選択される)多くの場合、原料となる式(12)で表されるアルカノエートを一種類とし、対応するモノマーユニット、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットをも含む、PHAを製造する。一方では、上述するように、原料となる式(12)で表されるアルカノエートは培養時に複数種を用いることができ、生成されるポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数を用いることが好ましい。一般には、式(12)で表されるアルカノエートを3種類程度まで原料に用いることで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、3種類以上の多くの種類の原料を利用することも可能である。

【0089】また、原料において、式(3)のベンゼン環上、R2の置換位置は、オルト位(2位または6位)、メタ位(3位または5位)ならびにパラ位(4位)のいずれを選択することも可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換フェノキシ基を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に応じて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、ベンゼン環上パラ位(4位)に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと遜色なく、より好適に用いることができる。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、R-体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソタクチックなポリマーである。その結果、かかる方法で生産されるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

【0090】さらに、本発明者らは、下記式(18)：

【0091】

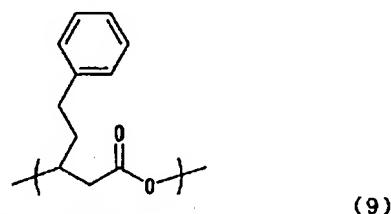
【化41】



【0092】で表される5-フェニル吉草酸(PVA)と酵母エキスを含有培地で培養することで、下記式(9)：

【0093】

【化42】



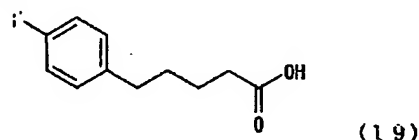
【0094】で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)モノマーユニットからなるホモポリマーを製造し得る微生物を得ることに成功した。

【0095】すなわち、前記第一の形態に含まれる、別の一つの態様は、上記式(18)で表されるPVAと酵母エキスを含有培地で、PVAを利用して上記式(9)で示される3HPVモノマーユニットの繰返し単位からなるポリ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(PHPV)ホモポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0096】本発明者らは、また、下記式(19)：

【0097】

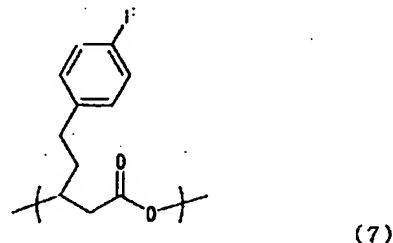
【化43】



【0098】で表される5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(FPVA)と酵母エキスを含有培地で培養することで、下記式(7)：

【0099】

【化44】

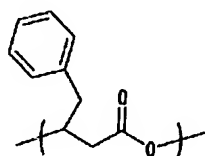


【0100】で表される3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(3HFPV)モノマーユニットからなるホモポリマーを製造し得る微生物を得ること

に成功した。

【0101】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(19)で表されるFPVAと酵母エキスを含有する培地で、FPVAを利用して上記式(7)で示される3HFPVモノマーユニットの繰返し単位からなるポリ-3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(PHFPV)ホモポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0102】これまでに、FPVAを基質とした、3HFPVをモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産の報告例はなく、また、PHFPVのホモポリマーであるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例もない。従って、上記方法で得られるPHFPVは新規であり、本発明が提供



(10)

【0107】で表される3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(3HPB)及び3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPHx)ユニットからなるコポリマーを生産できる微生物を得ることに成功した。

【0108】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(21)で表されるPHxAと酵母エキスを含有する培地で、PHxAを利用して上記式(10)及び(11)で示される3HPB及び3HPHxモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートコポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0109】これまでにPHxAを基質とした、3HPB及び3HPHxモノマーユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産の報告例はなく、また、3HPB及び3HPHxモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例もない。従って、上記方法で得られる3HPB及び3HPHxモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートは新規であり、本発明が提供する新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

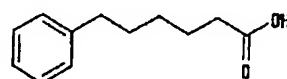
【0110】さらには、上記の一連の態様に詳述した方法に加えて、フェニル基を有する側鎖を所望とする基で置換した下記式(12)のアルカノエートをモノマー成分の原料として、対応する種々の側鎖を有するポリヒドロキシアルカノエートを、微生物を利用して選択的に製造することができる。原料として、かかる下記式(12)のアルカノエートを利用し、下記式(13)で示されるモノマーユニット組成を有するポリヒドロキシアル

する新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

【0103】本発明者らは、また、下記式(21)：

【0104】

【化45】

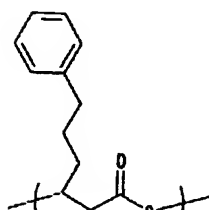


(21)

【0105】で表される6-フェニルヘキサン酸(PHxA)と酵母エキスを含有する培地で培養することにより下記式(10)及び(11)：

【0106】

【化46】

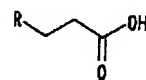


(11)

カノエートの製造方法も、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法による、前記第一の形態に含まれる。

【0111】

【化47】

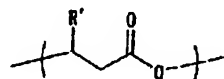


(12)

【0112】(式(12)中、Rは、下記一般式(2)で表される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)

【0113】

【化48】

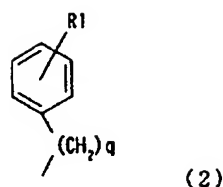


(13)

【0114】(式(13)中、R'は、上記式(12)においてRとして選択された基、ならびに、このRとして選択された基が、下記式(2)で示され、 $q=q_0$ の基である場合、対応するR1を有し、 $q=q_0-2$ 、 $q=q_0-4$ 、あるいは $q=q_0-6$ の基、から選択される少なくとも1つ以上の基である。なお、 q_0-2 、 q_0-4 、あるいは q_0-6 は、1以上の整数値のみを取り得る)

【0115】

【化49】



【0116】(式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{F}_5$ 、 $-\text{C}_3\text{F}_7$ から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択される)多くの場合、原料となる式(12)で表されるアルカノエートを一種類とし、対応するモノマーユニット、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットをも含む、PHAを製造する。一方では、上述するように、原料となる式(12)で表されるアルカノエートは培養時に複数種を用いることができ、生成されるポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数を用いることが好ましい。一般には、式(12)で表されるアルカノエートを3種類程度まで原料に用いることで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、3種類以上の多くの種類の原料を利用することも可能である。

【0117】また、原料において、式(2)のベンゼン環上、R1の置換位置は、オルト位(2位または6位)、メタ位(3位または5位)ならびにパラ位(4位)のいずれを選択することも可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換フェニル基を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に応じて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、ベンゼン環上パラ位(4位)に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと遜色なく、より好適に用いることができる。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、R-体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソタクチックなポリマーである。その結果、かかる方法で生産されるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

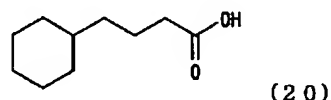
【0118】さらに、本発明者らは、基質として4-シクロヘキシル酪酸(CHBA)を用い、CHBA及び酵母エキスを含有する培地中で、微生物を培養してポリヒドロキシアルカノエートを生産させ、菌体内に蓄積させると、そのポリヒドロキシアルカノエートは、モノマーユニット中に、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸(3HCHB)を高い比率で含むことを見出し、また、収率も十分に高いものであることを見出した。また、取得した3HCHBを含むポリヒドロキシアルカノエートについて、精製処理を行うことにより、3HCH

Bモノマーユニットの繰り返し単位からなるPHCHBホモポリマーを分離可能であることを見出した。

【0119】すなわち、前記第一の形態に含まれる、別の一つの態様は、3HCHBモノマーユニットからなるポリ-3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸(PHCHB)の製造方法であり、下記式(20)：

【0120】

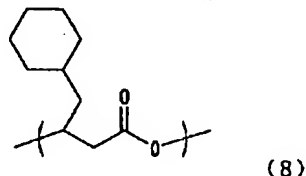
【化50】



【0121】で表されるCHBAおよび酵母エキスを含有する培地で微生物を培養する工程を含むことを特徴とする、下記式(8)：

【0122】

【化51】



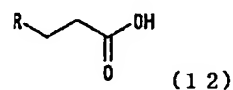
【0123】で表される3HCHBモノマーユニットからなるPHCHBホモポリマーの製造方法である。

【0124】これまでに、PHCHBのホモポリマーであるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例はない。従って、上記方法で得られるPHCHBは新規であり、本発明が提供する新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

【0125】さらには、前記の態様に詳述した方法に加えて、シクロヘキシル基を有する側鎖を所望とする基で置換した下記式(12)のアルカノエートをモノマー成分の原料として、対応する種々の側鎖を有するポリヒドロキシアルカノエートを、微生物を利用して選択的に製造することができる。原料として、かかる下記式(12)のアルカノエートを利用し、下記式(13)で示されるモノマーユニット組成を有するポリヒドロキシアルカノエートの製造方法も、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法による、前記第一の形態に含まれる。

【0126】

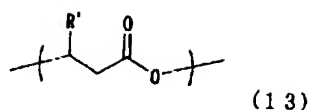
【化52】



【0127】(式(12)中、Rは、下記一般式(4)で表される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)

【0128】

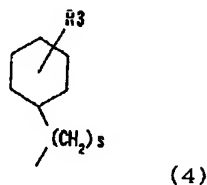
【化53】



【0129】式(13)中、R'は、上記式(12)においてRとして選択された基、ならびに、このRとして選択された基が、下記式(4)で示され、 $s=s_0$ の基である場合、対応するR3を有し、 $s=s_0-2$ 、 $s=s_0-4$ 、あるいは $s=s_0-6$ の基、から選択される少なくとも1つ以上の基である。なお、 s_0-2 、 s_0-4 、あるいは s_0-6 は、1以上の整数値のみを取り得る。

【0130】

【化54】



【0131】式(4)中、R3は、水素原子(H)、ハロゲン原子、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{F}_5$ 、 $-\text{C}_3\text{F}_7$ から選択される基であり、 s は、1~8の整数から選択される。多くの場合、原料となる式(12)で表されるアルカノエートを一種類とし、対応するモノマーユニット、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットをも含む、PHAを製造する。一方では、上述するように、原料となる式(12)で表されるアルカノエートは培養時に複数種を用いることができ、生成されるポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数を用いることが好ましい。一般には、式(12)で表されるアルカノエートを3種類程度まで原料に用いることで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、3種類以上の多くの種類の原料を利用することも可能である。

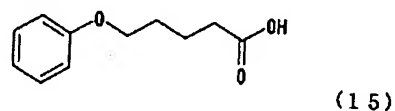
【0132】また、原料において、式(4)のシクロヘキシル環上、R3の置換位置は、1位、2位(または6位)、3位(または5位)ならびに4位のいずれを選択することも可能であり、加えて、cis配置とtrans配置のどちらをも選択可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換シクロヘキシル環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に応じて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、シクロヘキシル環上4位に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと遜色なく、より好適に用いることができ

る。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、R-体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソタクチックなポリマーである。その結果、かかる方法で生産されるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

【0133】さらに、本発明者らは、下記式(15)：

【0134】

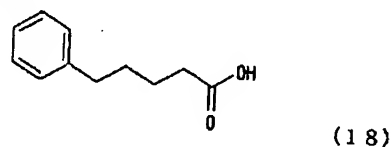
【化55】



【0135】で表される5-フェノキシ吉草酸(PxV A)及び下記式(18)：

【0136】

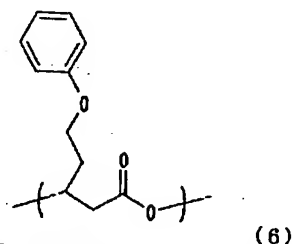
【化56】



【0137】で表される5-フェニル吉草酸(PVA)と酵母エキスを含有培地で培養することで、下記式(6)：

【0138】

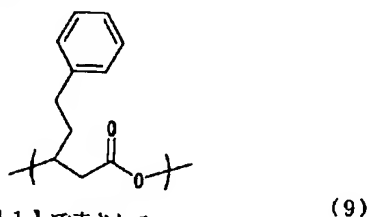
【化57】



【0139】で表される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)モノマーユニット及び下記式(9)：

【0140】

【化58】



【0141】で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)モノマーユニットからなるコポリマーを製造し得る微生物を得ることに成功した。

【0142】すなわち、前記第一の形態に含まれる、別の一つの態様は、上記式(15)及び(18)で表され

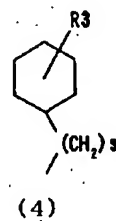
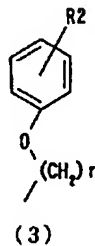
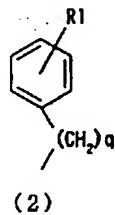
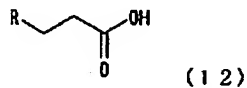
るP_xVA及びPVAと酵母エキスとを含む培地で、P_xVA及びPVAを利用して上記式(6)及び(9)で示される3HP_xVモノマーユニット及び3HPVモノマーユニットの繰返し単位からなるポリ(3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸/3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸)コポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0143】これまでにP_xVA及びPVAを基質とした、3HP_xV及び3HPVモノマーユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産の報告例はなく、また、3HP_xV及び3HPVモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例もない。従って、上記方法で得られる3HP_xV及び3HPVモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートは新規であり、本発明が提供する新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

【0144】さらには、前記の態様に詳述した方法に加えて、下記式(12)のアルカノエートのうちから選択される、複数種の原料アルカノエートを利用し、対応する種々の側鎖を有するモノマーユニット複数種を含むポリヒドロキシアルカノエートを、微生物を利用して選択的に製造することができる。すなわち、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法の第一の形態は、複数種の原料アルカノエートを利用し、対応する種々の側鎖を有するモノマーユニット複数種を含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法の態様をも含む。すなわち、下記式(12)：

【0145】

【化59】

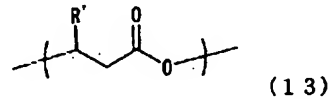


【0150】(式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択される；式(3)中、R2は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、rは、1~8の整数から選択される；式(4)中、R3は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、sは、1~8の整数から選択される)で表される少なくとも1以上のモノマーユニットを有するポリヒド

【0146】(式(12)中、Rは、下記一般式(2)、一般式(3)、あるいは一般式(4)のいずれかで示される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)で表されるアルカノエートと酵母エキスとを含む培地で微生物を培養し、微生物菌体からポリヒドロキシアルカノエートを抽出して、下記式(13)：

【0147】

【化60】



【0148】(式(13)中、R'は、上記式(12)においてRとして選択された基、ならびに、このRとして選択された基が、下記式(2)で示され、q=q₀の基である場合、対応するR1を有し、q=q₀-2、q=q₀-4、あるいはq=q₀-6の基、下記式(3)で示され、r=r₀の基である場合、対応するR2を有し、r=r₀-2、q=r₀-4、あるいはr=r₀-6の基、下記式(4)で示され、s=s₀の基である場合、対応するR3を有し、s=s₀-2、s=s₀-4、あるいはs=s₀-6の基、から選択される少なくとも1つ以上の基である。なお、q₀-2、r₀-2あるいはs₀-2、q₀-4、r₀-4あるいはs₀-4、q₀-6、r₀-6あるいはs₀-6は、1以上の整数値のみを取り得る)

【0149】

【化61】

ロキシアルカノエートを取得することを特徴とする製造方法である。特に、原料とする少なくとも1以上のアルカノエートに対応した側鎖を保持するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートを取得することを特徴とする製造方法である。つまり、複数種の原料アルカノエートを利用する際にも、ポリヒドロキシアルカノエート中に取り込まれるモノマーユニットとして、選択された式(12)に示すアルカノエート複数種に応じて、モノマーユニットの側鎖構造が各アルカノエートに対応した少なくとも1つ以上の側鎖構造を有する

ことを特徴とするモノマーユニットを有する、特には、各アルカノエートに由来する各一種のモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0151】この方法においては、原料となる式(12)で表されるアルカノエートを一種類とし、対応するモノマーユニット、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットをも含む、PHAを製造することができる。また、上述するように、原料となる式(12)で表されるアルカノエートは培養時に複数種を用いることもでき、その際には、生成されるポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数を用いることが好ましい。一般には、式(12)で表されるアルカノエートを5種類程度まで原料に用いることで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、5種類以上の多くの種類の原料を利用することも可能である。例えば、上記の一般式(2)、一般式(3)ならびに一般式(4)の三種をいずれも含み、それぞれ3種類程度までを選択し、合計して、5種類を超える原料を用いることも可能である。

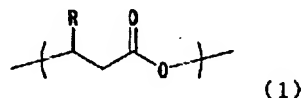
【0152】また、一般式(2)におけるベンゼン環上の置換基R1、ならびに一般式(3)におけるベンゼン環上の置換基R2は、オルト位(2位または6位)、メタ位(3位または5位)ならびにパラ位(4位)のいずれを選択することも可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換ベンゼン環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に応じて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、ベンゼン環上パラ位(4位)に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと同様に用いることができる。同じく、一般式(4)のシクロヘキシル環上、R3の置換位置は、1位、2位(または6位)、3位(または5位)ならびに4位のいずれを選択することも可能であり、加えて、cis配置とtrans配置のどちらをも選択可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエ

ートは、対応する置換シクロヘキシル環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に応じて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、シクロヘキシル環上4位に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと同様に用いることができる。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、R-体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソタクチックなポリマーである。その結果、かかる方法で生産されるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

【0153】以上に代表的な態様を示して、詳述してきたように、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法においては、原料として、アルカノエートの側鎖を所望とする基で置換した誘導体を用いることで、モノマー成分として、対応する種々の側鎖を有するポリヒドロキシアルカノエートを、微生物を利用して選択的に製造することができる。従って、本発明は、かかる方法により得られる、下記一般式(1)で示されるモノマーユニット組成を有するポリヒドロキシアルカノエートの発明も提供する。すなわち、本発明にかかる新規なポリヒドロキシアルカノエートは、下記一般式(1)で示されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートである。

【0154】

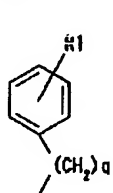
【化62】



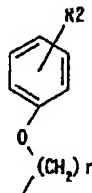
【0155】(式(1)中、Rは、下記一般式(2)、一般式(3)、あるいは一般式(4)のいずれかで示される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)

【0156】

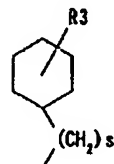
【化63】



(2)



(3)



(4)

【0157】(式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択さ

れる；式(3)中、R2は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、rは、1~8の整数から選択される；式

(4) 中、R3は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO₂、-CF₃、-C₂F₅、-C₃F₇から選択される基であり、sは、1~8の整数から選択される；但し、上記一般式(1)におけるRとして、一種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=2の基、R1=Hでq=3の基、式(3)において、R2=ハロゲン原子でr=2の基、R2=-CNでr=3の基、R2=-NO₂でr=3の基、は、選択肢からは除外され、二種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=3及び5の二種の基の組み合わせ、式(3)において、R2=Hでr=1及び3の二種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2及び4の二種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2及び6の二種の基の組み合わせ、R2=ハロゲン原子でr=2及び4の二種の基の組み合わせ、は、選択肢からは除外され、三種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=3、5及び7の三種の基の組み合わせ、式(3)において、R2=Hでr=1、3及び5の三種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2、4及び6の三種の基の組み合わせ、は、選択肢からは除外される。

なお、前記のように本発明のポリヒドロキシアルカノエートは、一般式(1)で表されるモノマーユニットを一種類含むものの他、複数種を含むことができるが、目的とするポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数のモノマーユニットを選択すると良い。一般には、式(1)で表されるモノマーユニットを合計10種類程度含むように選択することで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、10種類を超える多くの種類のモノマーユニットを含む構成とすることも可能である。

【0158】例えば、かかる一般式(1)で表されるモノマーユニットを複数種を含むポリヒドロキシアルカノエートを微生物に生産させる際には、原料のアルカノエートに対応するモノマーユニットの他、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットを含むものとなる。従って、原料のアルカノエート自体は5種類程度であっても、それぞれ、副生物のモノマーユニットを含め二種以上のモノマーユニットを与える結果、合計して10種類以上のモノマーユニットを含むPHAとなるものも、本発明に包含される。さらには、例えば、上記の一般式(2)、一般式(3)ならびに一般式(4)の三種をいずれをも含み、それぞれ3種類程度までを選択し、合計して、10種類程度の原料アルカノエートの種類となり、若干の副生物モノマーユニットを含めて、10種類以上のモノマーユニットを含むPHAとなるものも、本発明に包含される。

【0159】また、一般式(2)におけるベンゼン環上の置換基R1、ならびに一般式(3)におけるベンゼン環上の置換基R2は、オルト位(2位または6位)、メ

タ位(3位または5位)ならびにパラ位(4位)のいずれを選択することも可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換ベンゼン環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に於いて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、ベンゼン環上パラ位(4位)に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと同色なく、より好適に用いることができる。同じく、一般式(4)のシクロヘキシル環上、R3の置換位置は、1位、2位(または6位)、3位(または5位)ならびに4位のいずれを選択することも可能であり、加えて、cis配置とtrans配置のどちらをも選択可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換シクロヘキシル環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を選択するかは、目的とする機能性、物性に於いて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、シクロヘキシル環上4位に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと同色なく、より好適である。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、R-体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソタクチックなポリマーである。その結果、かかる微生物を利用する方法で生産できるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

【0160】

【発明の実施の形態】本発明のPHAの製造方法は、微生物を培養する際、培地に原料の式(12)のアルカノエートに加えて、酵母エキスを添加することで、微生物が産生・蓄積するPHAにおいて、目的とするモノマーユニットの含有率を著しく高いものとする、あるいは目的とするモノマーユニットのみとする点を特徴としている。この特定のモノマーユニットの優先化を促進する効果は、培地中にPHAの原料となるアルカノエート以外の炭素源として、酵母エキスのみを添加することにより得られている。

【0161】微生物によるPHAの製造に際して、培地に酵母エキスを利用する例として、特開平5-49487号公報に記載の、ロドバクター属(Rhodobacter sp.)に属する微生物を用いた方法が挙げられる。しかしながら、この従来方法は、置換基を有しないヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとする、一般的なPHB及びPHVを生産する方法である。本発明の目的とするようなPHAの生合成経路は、PHB及びPHVを生産する生合成経路とは独立した経路であることが知られており、特開平5-49487号公報において

は本発明の目的とするようなPHAの合成経路における酵母エキスの効果については何ら言及がない。また、酵母エキスの効果も、微生物が一般的に生産するPHB及びPHVに関して、酵母エキスを添加すると、単に菌体内のPHA蓄積量の増大が図られる効果があることを示すのみであり、増殖のために酵母エキスが添加されているわけではないことが明記されている。本発明は式(12)のアルカノエートと酵母エキスを共存させることで増殖とともにPHAの産生・蓄積を行うものであり、酵母エキスの発揮する効果が全く異なる。さらに本発明の効果である、特定のモノマーユニットの優先化について何ら言及されておらず、本発明のように、微生物が生産するPHA組成における、フェノキシ基、フェニル基及びシクロヘキシル基を置換基として有する特定のモノマーユニットの優先化という効果は示していない。

【0162】さらに、微生物によるPHAの生産に酵母エキスを利用する例としては、前述の特許第2989175号公報に記載のシュードモナス・プチダを用いた方法が挙げられる。ここで開示されているPHAの製造方法は2段階培養によるものであり、PHAの蓄積は2段階目の培養においてのみ、炭素源以外の栄養源の制限下で行うことが開示されている。この点で、本発明における、式(12)のアルカノエートと酵母エキスを含む培地での1段階目の培養のみで、所望のPHAの合成・蓄積を行う方法とは構成/効果ともに全く異なる。また、特許第2989175号における酵母エキスの効果は、2段階培養を用いる際、1段階目の培養において、単に2段階目の培養に用いる微生物の増殖のみを目的としたものであり、1段階目は栄養源の豊富な条件下で培養されると明記されている。ここで、PHAの基質は1段階目には共存していない。本発明における2段階培養での酵母エキスの効果は、1段階目の培養において式(12)のアルカノエートと酵母エキスを共存させることで増殖とともにPHAの産生・蓄積を行うものであり、1段階目の培養における酵母エキスの発揮する効果が全く異なる。また、特許第2989175号では1段階目の培養に炭素源としてクエン酸、オクタン酸、ノナン酸のいずれかが共存しており、式(12)のアルカノエートと酵母エキスのみを共存させる本発明とは、構成においても異なるものである。

【0163】また、本発明中の3HPxBをモノマーユニットとして含むPHAを生産し、菌体内に蓄積する微生物の報告例として、Macromolecules, 29, 3432-3435, 1996に記載の、シュードモナス・オレオボランスを用いた方法がある。しかしながら、このシュードモナス・オレオボランスを用いる方法は、8-フェノキシオクタン酸(PxOA)のみを基質として用いるものであり、本発明の、例えば、 β 酸化によりアセチル-CoAを生成し得ない、PxBAを基質として酵母エキスを共に用いる方法とは全く異なる

点で、本質的な差異を持つものである。さらに、合成されるPHAは、基質であるPxOA由来の3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸と、代謝産物由来の副生物である3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸及び3HPxBの3種類のモノマーユニットからなる共重合体が生産される。それに対して、本発明の方法では、酵母エキスをを用いることでPxBA由来の3HPxBのみをフェノキシ基含有モノマーユニットとして含むPHAの製造についても可能となっており、この製造されるPHA自体も、前述の報告例と本発明とは、明確に異なっている。また、PxBAを基質とした、3HPxBをモノマーユニットとして含むPHAの微生物生産の報告例はなく、また、3HPxBのみをフェノキシ基含有モノマーユニットとして含むPHAの微生物生産に関する報告例もない。

【0164】以下に、本発明の製造方法をより詳しく説明する。

【0165】本発明に用いる微生物としては、式(12)のアルカノエートを基質とし、当該アルカノエートからPHAを生産・蓄積しうる微生物であればいかなる微生物でもよいが、本発明者らの研究によると、シュードモナス属の細菌が良く、その中でもシュードモナス・チコリアイ・YN2株(*Pseudomonas cichorii* YN2, FERM P-17411)、シュードモナス・チコリアイ・H45株(*Pseudomonas cichorii* H45, FERM P-17410)、シュードモナス・プチダ・P91株(*Pseudomonas putida* P91, FERM P-17409)及びシュードモナス・ジェッセニイ・P161株(*Pseudomonas jessenii* P161, FERM P-17445)が好ましい微生物であることを見出した。なお、これらの菌株以外のものでも、当該アルカノエートを基質とした培養によって、例えば*Pseudomonas*属に属する細菌のスクリーニングを行うことで、本発明のPHAの製造方法に利用し得る微生物を得ることも可能である。例えばシュードモナス属の細菌としては、シュードモナス・オレオボランスを利用することが可能である。また、シュードモナス属に属する微生物に加えて、アエロモナス(*Aeromonas* sp.)属、コマモナス(*Comamonas* sp.)属、バークホルデルシア(*Burkholderia* sp.)属などに属し、当該アルカノエートを原料(基質)として用いて、対応する3-ヒドロキシアルカノエートをモノマーユニットとして含むPHAを生産する微生物を用いることも可能である。しかしながら、生産能力などの点を考慮すると、上記の4種の菌株を好ましい菌株として挙げることができる。

【0166】以下にYN2株、H45株、P91株及びP161株についての詳細を示す。

<Y N 2株の菌学的性質>

培養温度 : 30℃

形態学的性質

細胞形態 : 桿菌、 $0.8\mu\text{m} \times (1.5 \sim 2.0)\mu\text{m}$

グラム染色 : 陰性

胞子形成 : 陰性

運動性 : 陽性

コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、表層なめらか、光沢、半透明

生理学的性質

カタラーゼ : 陽性

オキシダーゼ : 陽性

O/F試験 : 非発酵性

硝酸還元 : 陰性

インドール産生 : 陽性

ブドウ糖酸性化 : 陰性

アルギニンジヒドロラーゼ : 陰性

ウレアーゼ : 陰性

エスクリン加水分解 : 陰性

ゼラチン加水分解 : 陰性

 β -ガラクトシダーゼ : 陰性

基質資化能

ブドウ糖 : 陽性

L-アラビノース : 陽性

D-マンノース : 陰性

D-マンニトール : 陰性

N-アセチル-D-グルコサミン : 陰性

マルトース : 陰性

グルコン酸カリウム : 陽性

n-カプリン酸 : 陽性

アジピン酸 : 陰性

d l-リンゴ酸 : 陽性

クエン酸ナトリウム : 陽性

酢酸フェニル : 陽性

King's B寒天での蛍光色産生 : 陽性

4% NaClでの生育 : 陽性(弱)

ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積 : 陰性(*)

Tween 80の加水分解 : 陽性

* nutrient agar培養コロニーをズダンブラックで染色することで判定。

<H 4 5株の菌学的性質>

形態学的性質

細胞の形と大きさ : 桿菌、 $0.8\mu\text{m} \times (1.0 \sim 1.2)\mu\text{m}$

細胞の多形性 : なし

運動性 : あり

胞子形成 : なし

グラム染色性 : 陰性

コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、表層なめらか、光沢

、クリーム色

生理学的性質

カタラーゼ : 陽性

オキシダーゼ	: 陽性
O/F試験	: 酸化的
硝酸塩の還元	: 陰性
インドールの生成	: 陰性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陰性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性
ゼラチン加水分解	: 陰性
β -ガラクトシダーゼ	: 陰性
King'sB寒天での蛍光色素産生	: 陽性
4%NaClでの生育	: 陰性
ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積	: 陰性
基質資化能	
ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陰性
D-マンノース	: 陽性
D-マンニトール	: 陽性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陽性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
d1-リンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性
<P91株の菌学的性質>	
形態学的性質	
細胞の形と大きさ	: 桿菌、 $0.6\mu\text{m} \times 1.5\mu\text{m}$
細胞の多形性	: なし
運動性	: あり
胞子形成	: なし
グラム染色性	: 陰性
コロニー形状、クリーム色	: 円形、全縁なめらか、低凸状、表層なめらか、光沢
生理学的性質	
カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F試験	: 酸化型
硝酸塩の還元	: 陰性
インドールの生成	: 陰性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陽性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性
ゼラチン加水分解	: 陰性
β -ガラクトシダーゼ	: 陰性
King'sB寒天での蛍光色素産生	: 陽性
基質資化能	
ブドウ糖	: 陽性

L-アラビノース	: 陰性
D-マンノース	: 陰性
D-マンニトール	: 陰性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陰性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
dl-リンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性

<P161株の菌学的性質>

形態学的性質

細胞の形と大きさ	: 球状、 $\phi 0.6 \mu\text{m}$ /桿状、 $0.6 \mu\text{m} \times 1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$
細胞の多形性	: あり(伸長型)
運動性	: あり
胞子形成	: なし
グラム染色性	: 陰性
コロニー形状	: 円形、全縁なめらか、低凸状、表層なめらか、淡黄色

生理学的性質

カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F試験	: 酸化型
硝酸塩の還元	: 陽性
インドールの生成	: 陰性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陽性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性
ゼラチン加水分解	: 陰性
β -ガラクトシダーゼ	: 陰性

King'sB寒天での蛍光色素産生: 陽性

基質資化能

ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陽性
D-マンノース	: 陽性
D-マンニトール	: 陽性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陽性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
dl-リンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性

【0167】以上の菌学的性質から、バージェズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー・第1巻(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volu

me1) (1984年) 及びバージェズ・マニュアル・オブ・ディタミネーティブ・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第9版(199

4年)に基づいて検索したところ、YN2株及びH45株は、シュードモナス・チコリアイ(*Pseudomonas cichorii*)に、また、P91株は、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)に、それぞれ属すると判明した。従って、これらの菌株をシュードモナス・チコリアイ・YN2株、シュードモナス・チコリアイ・H45株、シュードモナス・プチダ・P91株とそれぞれ命名した。

【0168】一方、P161株は、シュードモナス属(*Pseudomonas* sp.)に属すると判明したものの、その菌学的性質から分類学上の位置を確定するには至らなかった。そこで、遺伝的性質からの分類を試みるために、図12に示すP161株の16S rRNAの塩基配列を決定し(配列番号:1、cDNA to rRNA)、公知のシュードモナス属微生物の16S rRNAの塩基配列との相同性を調べた。その結果、P161株とシュードモナス・ジェッセニイ(*Pseudomonas jessenii*)との間で、塩基配列の相同性が極めて高いことが判明した。さらに、System. Appl. Microbiol., 20, 137-149 (1997)、及び、System. Appl. Microbiol., 22, 45-58 (1999)に記載されたシュードモナス・ジェッセニイの菌学的性質と、P161株の菌学的性質との間で高い類似性も認められた。以上の結果から、P161株はシュードモナス・ジェッセニイに属せしめるのが妥当と判断されたため、P161株をシュードモナス・ジェッセニイ・P161株と命名した。

【0169】なお、YN2株は寄託番号「FERM P-17411」として、H45株は寄託番号「FERM P-17410」として、P91株は寄託番号「FERM P-17409」として、P161株は寄託番号「FERM P-17445」として、通商産業省 工業技術院 生命工学工業技術研究所(生命研NIBH特許微生物寄託センター)にそれぞれ寄託されている。

【0170】これらの微生物を、所望とするモノマーユニット導入用の原料、一般式(12)のアルカノエートと酵母エキスを含む培地で培養することで、目的とするPHAを製造することができる。

【0171】本発明のPHAの製造方法に用いる微生物の通常の培養、例えば、保存菌株の作成、菌数や活性状態の確保のための培養などには、微生物の生育や生存に悪影響を及ぼすものでない限り、一般的な天然培地や栄養源を添加した合成培地等、いかなる種類の培地をも用いることができる。温度、通気、攪拌などの培養条件は用いる微生物に応じて適宜選択する。

【0172】一方、微生物を用いてPHAを生産・蓄積させる場合は、PHA生産用の培地として、対応する一般式(12)のアルカノエートを少なくとも含んだ無機培地を用いることができる。その際、PHAの原料とな

るアルカノエート以外の炭素源/エネルギー源としては、酵母エキスのみを添加することが特徴である。

【0173】上記の培養方法に用いる無機培地としては、リン源(例えば、リン酸塩等)、窒素源(例えば、アンモニウム塩、硝酸塩等)等、微生物の増殖に必須な成分を含んでいるものであればいかなるものでも良く、例えば、代表的な無機培地としては、MSB培地、E培地(J. Biol. Chem., 218, 97-106 (1956))、M9培地等を挙げることができる。

【0174】なお、本発明における実施例で用いるM9培地の組成は以下の通りである。

【0175】 Na_2HPO_4 : 6.2g

KH_2PO_4 : 3.0g

NaCl : 0.5g

NH_4Cl : 1.0g

(培地1リットル中、pH7.0)

培養条件としては、例えば、15~40℃、好ましくは20~35℃で、好気条件下での振盪培養や攪拌培養が挙げられる。

【0176】培養工程は、バッチ式、流動バッチ式、半連続培養、連続培養、リアクター形式など、通常の微生物の培養に用いるいかなる方法をも用いることができ、これらの工程を複数段接続した多段方式を採用してもよい。

【0177】例えば、二段階の培養工程を含む方法としては、一段階目では、増殖用炭素源として酵母エキスを0.1重量%から1.0重量%程度、及び、式(12)のアルカノエートを0.01重量%から0.5重量%程度含んだ無機培地等で対数増殖後期から定常期に達する時点まで培養し、二段階目では、一段階目での培養終了後の菌体を遠心分離等で回収したのち、原料の式(12)のアルカノエートを0.01重量%から0.5重量%程度含んだ、窒素源が存在しない無機培地で更に培養し、培養終了後、菌体を回収して所望のPHAを抽出する方法がある。

【0178】また、酵母エキスを0.1重量%から1.0重量%程度、及び、式(12)のアルカノエートを0.01重量%から0.5重量%程度を加えた無機培地で培養し、対数増殖後期から定常期に達した時点で菌体を回収して所望のPHAを抽出する方法もある。

【0179】その際、培地に添加する酵母エキス濃度は、式(12)のアルカノエートの種類、微生物の属種、菌体密度、あるいは培養方法に応じて適宜選択するものであるが、通常、培地中の含有率を、0.1重量%から1.0重量%程度に選択して、添加するとよい。また、酵母エキスは、微生物の培養などに汎用される市販の酵母エキス何れについても、好適に用いることが可能である。また、酵母エキスに代えて、酵母エキスの成分を当然に含んでいる、酵母の凍結乾燥物を粉碎したもの

などを用いることも可能である。一方、原料となる式(12)のアルカノエートの濃度も、微生物の属種、菌体密度、あるいは培養方法に応じて適宜選択するものであるが、通常、培地中の含有率を0.01重量%から0.5重量%程度に選択して、添加するとよい。

【0180】なお、先に記載したYN2株、H45株、P91株及びP161株のいずれかを用いる場合において、酵母エキスを代えて、例えば、C6~C12の中鎖脂肪酸(例えばオクタン酸やノナン酸等)を増殖用炭素源として用いた場合、添加されている中鎖の脂肪酸に由来するモノマーユニットが混在したPHAが取得されてくる。具体的には、増殖用炭素源として、オクタン酸やノナン酸等の中鎖の脂肪酸を加え、原料として式(12)のアルカノエートを添加した無機培地等で、対数増殖後期から定常期の時点まで培養し、菌体を遠心分離等で回収したのち、中鎖の脂肪酸と式(12)のアルカノエートとを添加し、窒素源が存在しない無機培地で更に培養する方法を用いた場合が挙げられる。あるいは、無機培地中の窒素源濃度を1/10程度に制限し、中鎖の脂肪酸と式(12)のアルカノエートとを加えた培地で培養し、対数増殖後期から定常期の時点で菌体を回収して、所望のPHAを抽出する方法を用いた場合が挙げられる。これら増殖用炭素源として、中鎖の脂肪酸を培地に添加する方法を用いる場合には、取得されるPHAは、増殖用炭素源として添加されている、中鎖の脂肪酸に由来するモノマーユニットが混在しているPHAとなっている。

【0181】これに対して、本発明では、先に述べた通り、酵母エキスと式(12)のアルカノエートとを含み、その他に炭素源を含まない培地で上記微生物を培養することによって、目的とする式(12)のアルカノエートに由来するモノマーユニット以外の、不要なモノマーユニットの混在が少ない、あるいは全くない、所望のPHAが生産・蓄積される。

【0182】本発明の方法における菌体からのPHAの回収は、通常行われているクロロホルム等の有機溶媒による抽出が最も簡便ではあるが、有機溶媒が使用しにくい環境中においては、SDS等の界面活性剤による処理、リゾチーム等の酵素による処理、EDTA、次亜塩素酸ナトリウム、アンモニア等の薬剤による処理によってPHA以外の菌体成分を除去して、PHAを回収する方法を用いることもできる。

【0183】なお、微生物の培養、微生物によるPHAの生産と菌体内への蓄積、並びに、菌体からのPHAの回収は、上記の方法に限定されるものではない。例えば、本発明にかかるPHAの製造方法に利用される微生物は上記の4種の菌株以外でも、これら4種の菌株と同様の本発明にかかるPHA生産の生産能を有する微生物を用いることができる。

【0184】上記の方法を利用することで、先に式

(1)で示す繰返し単位を有するPHAを得ることができ、このPHAの数平均分子量は少なくとも1万以上であることが望ましく、1万~20万の範囲であることが好ましい。すなわち、このPHAにおいて、ポリマーとして所望の特性を安定に得る上では、具体的には、ポリマーを構成するモノマーユニットの構造により規定されるガラス転移温度、軟化点、融点、結晶性、配向性などの特性を一定の範囲とする上では、少なくとも数平均分子量が1万程度となる繰返し数を有することが望ましい。一方、加工等において、溶解操作などの処理の簡便性から、数平均分子量が20万程度までであることが好ましい。通常、1万~10万の範囲とすると、より好ましい。また、本発明の製造方法で得られるPHAの数平均分子量は、1万以上、およそ2万以上であり、前記のポリマーとしての安定した物性の発現を十分に期待できる範囲内にある。

【0185】

【実施例】以下に、具体例を示し、本発明をより詳しく説明する。これらの具体例は、本発明における最良の態様の一例であるが、本発明は以下の具体例によってなんら限定されるものではない。

A：本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(14)の4-フェノキシ酪酸(PxBA)を原料とする、式(5)で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(HPxBA)に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート：ポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(PHPxB)の製造に適用した一例を示す。

【0186】(実施例A-1)酵母エキス0.5%、PxBA0.1%とを含むM9培地200mlにP91株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、PxBA0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0187】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。また、このPHAの分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム; ポリマーラボラトリー・PL gel MIXED-

C・5 μ m、溶媒：クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0188】表3に同定結果と平均分子量を示す。得られたPHAは、そのモノマーユニットとして、式(5)で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸に由来

するモノマーユニットのみを含み、ポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸であることが判る。

【0189】

【表3】

P. putida P91株

菌体乾燥重量	520 mg/L
ポリマー乾燥重量	14 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	2.7%
ポリマー分子量	Mn=42,000 Mw=84,000
モノマーユニット組成(エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサ酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸	100%

【0190】(実施例A-2)酵母エキス0.5%、PxB A0.2%とを含むM9培地200mlにP91株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0191】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたP

HAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表4に同定結果を示す。得られたPHAは、そのモノマーユニットとして、式(5)で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸に由来するモノマーユニットのみを含み、ポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸であることが判る。

【0192】

【表4】

P. putida P91株

菌体乾燥重量	590 mg/L
ポリマー乾燥重量	8 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	1.4%
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサ酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸	100%

【0193】(実施例A-3) P91株の培養菌体から回収したPHAについて、核磁気共鳴装置 (FT-NMR: Bruker DPX400) を用いて、以下の条件で分析した。

【0194】測定核種: ^1H 、使用溶媒: 重クロロホルム (TMS入り)。

【0195】その測定結果を図1に、また、表5に各信号の解析結果 (帰属) を示す。表5には、下記する3-

^1H -NMRスペクトル測定結果

ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸の結果から、PHAは、式(5)で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸に由来するモノマーユニットのみを含み、ポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸であることが確認される。

【0196】

【表5】

共鳴周波数: 400MHz

δ 値 (ppm)	帰 属
0.8~1.6	不純物
2.71	d; 2H, a
3.97	d; 2H, c
5.47	m; 1H, b
6.79	d; 2H, f, h
6.90	t; 1H, g
7.19	t; 2H, e, i

m: multiplet, t: triplet, d: doublet

【0197】B: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(15)の5-フェノキシ吉草酸 (PxVA) を原料とする、式(6)で表される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (HPxVA) に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート: ポリ-3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (PHPxV) の製造に適用した一例を示す。

【0198】(実施例B-1) PxVAの合成
三つ口丸底フラスコに、240mlの脱水アセトンを入れ、ヨウ化ナトリウム (0.06モル)、炭酸カリウム (0.11モル) 及びフェノール (0.07モル) を加え、十分に攪拌した。この溶液中に、5-ブロモ吉草酸エチルエステル (0.06モル) を、窒素雰囲気下で滴下し、 $60 \pm 5^\circ\text{C}$ で還流し、24時間反応させた。反応

終了後、反応液をエバポレーターで濃縮乾固させ、塩化メチレンに再溶解し、溶液に水を加えて分液し、有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水した後エバポレーターで濃縮乾固した。得られた乾燥物 (反応物) に熱メタノールを加えて溶解させ、ゆっくり冷却して再沈殿させ、5-フェノキシ吉草酸エチルエステル (PxVA) を得た。この時点での、このエステルの5-ブロモ吉草酸エチルエステルに対する収率は、72モル%であった。

【0199】得られた反応物 (エステル) を5重量%になるようにエタノール-水 (9:1 (v/v)) に溶解し、10倍モル量の水酸化カリウムを加えて、 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ で4時間反応させ、エステルの加水分解を行った。この反応液を10倍量の0.1M塩酸水溶液に注加し、沈殿物をろ過により回収した。回収した沈殿物 (反応物) は

室温で36時間減圧乾燥した。得られた乾燥物を少量の熱エタノールに溶解させ、溶液を徐々に冷却して再沈殿させて室温で24時間減圧乾燥し、目的の化合物である5-フェノキシ吉草酸を得た。この目的化合物の5-プロモ吉草酸エチルエステルに対する収率は、53モル%であった。

【0200】得られた化合物の核磁気共鳴装置(NMR)による分析を以下の条件で行った。

<使用機器>

FT-NMR: Bruker DPX400

¹H共鳴周波数: 400MHz

<測定条件>

測定核種: ¹H

使用溶媒: CDCl₃

reference: キャピラリー封入TMS/CDCl₃

測定温度: 室温

図2にスペクトルのチャートを、表6に同定結果を示す。

【0201】

【表6】

¹H-NMRスペクトル測定結果

共鳴周波数: 400MHz

Chemical Shift/ppm	積分値/H	type	同定結果
1.562		broad	不純物
1.863	4	m	c, d
2.474	2	t	b
3.994	2	t	e
6.905	2	t	h, j
6.964	1	t	i
7.28	2	t	g, k
9.35		broad	-COOH

m: multiplet

t: triplet

d: doublet

【0202】この結果から、確かに所望のPxVAが合成されている事が確認された。

【0203】(実施例B-2) P91株によるPHPxVホモポリマーの製造

酵母エキス(DIFCO製)0.5重量%、PxVA 0.1重量%を含むM9培地200mlにP91株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、PxVA 0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を

遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0204】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得、これを秤量した。菌体及びポリマーの収率を表7に示す。

【0205】

【表7】

乾燥菌体 (mg/l)	乾燥ポリマー (mg/l)	収率 (乾燥ポリマー/乾燥菌体、%)
750	45	6.0

【0206】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。即ち、PHAサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、メインのピークは一本であり、そのマススペクトルから3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のメチルエステル化物であることがわかった。また、その他の微量

成分はPHAのモノマーユニットとは無関係のものであった。GC-MSのトータルイオンクロマトグラフィー(TIC)及びメインピークのマススペクトルを図3に示す。

【0207】また、得られたポリマーを以下の条件でNMR分析を行った。

<使用機器>

FT-NMR: Bruker DPX400

¹H共鳴周波数: 400MHz

<測定条件>

測定核種: ¹H

使用溶媒: CDCl₃

reference: キャピラリー封入TMS/CDCl₃

測定温度: 室温

図4にスペクトルのチャート、表8に同定結果を示

¹H-NMRスペクトル測定結果

す。

【0208】

【表8】

共鳴周波数: 400MHz

Chemical Shift / ppm	積分値 / H	type	同定結果
1.562		broad	不純物
2.009	2	m	d
2.585	2	d	b
3.9	2	m	e
5.365	1	m	c
6.81	2	m	h, j
6.89	1	t	i
7.21	2	t	g, k

m: multiplet

t: triplet

d: doublet

s: singlet

【0209】更に、得られたPHAの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー HLC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー PL gel MIXED-C (5 μ m)、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した結果、Mn=70000、Mw=121000であった。

【0210】以上の結果より、本発明の方法により、PxVAを原料とする、ポリ-3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のホモポリマー、及びその製造方法が示された。

【0211】(実施例B-3) H45株によるPHPxVホモポリマーの製造

酵母エキス (DIFCO製) 0.5重量%、PxVA

0.1重量%とを含むM9培地200mlにH45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0212】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得、これを秤量した。菌体及びポリマーの収率を表9に示す。

【0213】

【表9】

乾燥菌体 (mg/l)	乾燥ポリマー (mg/l)	収率 (乾燥ポリマー/乾燥菌体、%)
850	95	11.2

【0214】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。即ち、PHAサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3% (v/v) 含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー-質量分析装置 (GC-MS、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR (J&W社製)、EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、メインのピークは一本であり、そのマススペクトルから3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のメチルエステル化物であることがわかった。また、その他の微量成分はPHAのモノマーユニットとは無関係のものであった。GC-MSのトータルイオンクロマトグラフィー (TIC) 及びメインピークのマススペクトルを図5に示す。

【0215】更に、得られたPHAの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー HLC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー PL gel MIXED-C (5 μ m)、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した結果、Mn=64000、Mw=116000であった。

【0216】以上の結果より、本発明の方法により、PxVAを原料とする、ポリ-3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のホモポリマー、及びその製造方法が示された。

C: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(17)の5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸 (FPxVA) を原料とする、式(16)で表される3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸 (HFPxVA) に由来するモノマーユニットからな

るポリヒドロキシアルカノエート：ポリ-3-ヒドロキシ-5-（4-フルオロフェノキシ）吉草酸（PHFPxV）の製造に適用した一例を示す。

【0217】（実施例C-1）FPxVAの合成
三つ口丸底フラスコに、240mlの脱水アセトンを入れ、ヨウ化ナトリウム（0.06モル）、炭酸カリウム（0.11モル）及び4-フルオロフェノール（0.07モル）を加え、十分に攪拌した。この溶液中に、5-ブロモ吉草酸エチルエステル（0.06モル）を、窒素雰囲気下で滴下し、60±5℃で還流し、24時間反応させた。反応終了後、反応液をエバポレーターで濃縮乾固させ、塩化メチレンに再溶解し、水を加えて分液し、有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水した後、エバポレーターで濃縮乾固して反応物を得た。

【0218】得られた反応物に、熱メタノールを加えて溶解させ、溶液をゆっくり冷却して再沈殿させ、5-（4-フルオロフェノキシ）吉草酸エチルエステルを得た。この時点での、5-ブロモ吉草酸エチルエステルに対する収率は、68モル%であった。

【0219】得られた反応物（エステル）を5重量%になるようにエタノール-水（9：1（v/v））に溶解し、10倍モル量の水酸化カリウムを加えて、0～4℃で4時間反応させ、エステルの加水分解を行った。

¹H-NMRスペクトル測定結果

【0220】この反応液を10倍量の0.1M塩酸水溶液に注加し、沈殿物をろ過により回収した。回収した沈殿物（反応物）は室温で36時間減圧乾燥した。得られた乾燥物を少量の熱エタノールに溶解させ、溶液を徐々に冷却して再沈殿させて室温で24時間減圧乾燥し、目的の化合物である、式（17）で表される5-（4-フルオロフェノキシ）吉草酸を得た。この化合物の5-ブロモ吉草酸エチルエステルに対する収率は、49モル%であった。

【0221】得られた化合物について、以下の条件でNMR分析を行った。

<使用機器>

FT-NMR：Bruker DPX400

¹H共鳴周波数：400MHz

<測定条件>

測定核種：¹H

使用溶媒：CDCl₃

reference：キャピラリー封入TMS/CDCl₃

測定温度：室温

図6に¹H-NMRスペクトルチャートを、表10に同定結果を示す。

【0222】

【表10】

共鳴周波数：400MHz

Chemical Shift/ ppm	積分値/H	type	同定結果
1. 85	4	m	c, d
2. 46	2	t	b
3. 95	2	t	e
6. 83	2	t	h, j
6. 97	2	t	g, k
10. 15		broad	-COOH

m: multiplet

t: triplet

d: doublet

【0223】以上の結果から、確かに所望のFPxVAが合成されている事が確認された。

【0224】（実施例C-2）P91株によるPHFPxVホモポリマーの製造

酵母エキス（DIFCO製）0.5重量%と、FPxVA 0.1重量%を含むM9培地200mlにP91株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、FPxVA 0.1重量%を含む、窒素源（NH₄Cl）を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間

後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0225】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得、これを秤量した。菌体及びポリマーの収率を表11に示す。

【0226】

【表11】

乾燥菌体 (mg/l)	乾燥ポリマー (mg/l)	収率 (乾燥ポリマー/乾燥菌体、%)
700	35	5.0

【0227】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。即ち、PHAサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3% (v/v) 含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-M S、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR (J&W社製)、EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、メインのピークは一本であり、そのマススペクトルから3-ヒドロキシ-5- (4-フルオロフェノキシ) 吉草酸のメチルエステル化物であることがわかった。また、その他の微量成分はPHAのモノマーユニットとは無関係のものであった。3-ヒドロキシ-5- (4-フルオロフェノキシ) 吉草酸のメチルエステルのTIC及びマススペクトルを図7に示す。

【0228】更に、得られたPHAの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー H

¹H-NMRスペクトル測定結果

LC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー PL gel MIXED-C (5μm)、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した結果、Mn=68000、Mw=120000であった。

【0229】更に、核磁気共鳴装置 (NMR) を用いて以下の条件で得られたPHAの構造解析を行った。

<使用機器>

FT-NMR: Bruker DPX400

¹H共鳴周波数: 400MHz

<測定条件>

測定核種: ¹H

使用溶媒: CDCl₃

reference: キャピラリー封入TMS/CDCl₃

測定温度: 室温

図8に¹H-NMRスペクトルチャートを、表12に同定結果を示す。

【0230】

【表12】

共鳴周波数: 400MHz

Chemical Shift / ppm	積分値 / H	type	同定結果
~1.55			不純物
2.00	2	m	d
2.59	2	d	b
3.86	2	m	e
5.36	1	m	c
6.74	2	m	h, j
6.90	2	t	g, k

m: multiplet

t: triplet

d: doublet

【0231】以上の結果により、本発明の方法により、FPxVAを原料とする、ポリ-3-ヒドロキシ-5- (4-フルオロフェノキシ) 吉草酸のホモポリマー、及びその製造方法が示された。

【0232】(実施例C-3) H45株によるPHF PxVホモポリマーの製造

酵母エキス (DIFCO製) 0.5重量%、FPxVA 0.1重量%とを含むM9培地200mlにH45株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メ

タノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0233】この凍結乾燥ベレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得、これを秤量した。菌体及びポリマーの収率を表13に示す。

【0234】

【表13】

乾燥菌体 (mg / l)	乾燥ポリマー (mg / l)	収率 (乾燥ポリマー/乾燥菌体, %)
830	72	8.7

【0235】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。即ち、PHAサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3% (v/v) 含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-M

S、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR (J&W社製)、EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、メインのピークは一本でありそのマススペクトルから3-ヒドロキシ-5- (4-フルオロフェノキシ) 吉草酸のメチルエステル化物であることがわかった。GC

-MSのトータルイオンクロマトグラフィー (TIC) 及びメインピークのマスペクトルを図9に示す。

【0236】更に、得られたPHAの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー HLC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー PL gel MIXED-C (5 μ m)、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した結果、 $M_n=67000$ 、 $M_w=119000$ であった。

【0237】以上に結果より、本発明の方法により、F P \times VAを原料とする、ポリ-3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェノキシ) 吉草酸のホモポリマー、及びその製造方法が示された。

D: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(18)の5-フェニル吉草酸 (PVA) を原料とする、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (HPVA) に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート: ポリ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (PHPV) の製造に適用した一例を示す。

【0238】(実施例D-1) 酵母エキス (Difco 社製) 0.5%とPVA0.05%とを含むM9培地200mlにH45株を植菌し、30℃、125ストローク

ク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0239】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置 (GC-MS, 島津QP-5050、EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。また、このPHAの分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー・PL gel・MIXED-C・5 μ m、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算分子量) により測定した。表14に、同定結果、平均分子量、ならびに凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、収率を示す。

【0240】

【表14】

P. cichorii H45株

菌体乾燥重量	1050 mg/L
ポリマー乾燥重量	310 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	30%
ポリマー分子量	$M_n=1.5 \times 10^5$ $M_w=1.8 \times 10^5$
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサン酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸	100%

【0241】表14の結果から、菌体から抽出・回収されたポリマーは、PHAモノマーユニットとして、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸に由来するモノマーユニットのみを含むことが確認される。

【0242】(実施例D-2) 酵母エキス (Difco 社製) 0.5%とPVA0.1%とを含むM9培地20

0mlにH45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、PVA0.2%を含む、窒素源 (NH₄C1) を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0243】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。また、こ

のPHAの分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム; ポリマーラボラトリー・PL gel MIXED-C・5μm、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。表15に、同定結果、平均分子量、ならびに凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、収率を示す。

【0244】

【表15】

P. cichorii H45株

菌体乾燥重量	800 mg/L
ポリマー乾燥重量	320 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	40%
ポリマー分子量	Mn=9.7×10 ⁴ Mw=2.1×10 ⁵
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサン酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸	100%

【0245】表15の結果から、菌体から抽出・回収されたポリマーは、PHAモノマーユニットとして、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸に由来するモノマーユニットのみを含むことが確認される。

【0246】(実施例D-3)酵母エキス(Difco社製)0.5%とPVA0.1%とを含むM9培地200mlにP91株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、PVA0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0247】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表16に、同定結果、ならびに凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、収率を示す。

【0248】

【表16】

P. putida P91株

菌体乾燥重量	880 mg/L
ポリマー乾燥重量	96 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	11%
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサン酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸	100%

【0249】表16の結果から、菌体から抽出・回収されたポリマーは、PHAモノマーユニットとして、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸に由来するモノマーユニットのみを含むことが確認される。

【0250】(実施例D-4) 酵母エキス(Difco社製)0.5%とPVA0.1%を含むM9培地200mlにP161株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、PVA0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0251】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィ

ルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。また、このPHAの分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HLC-8020、カラム;ポリマーラボラトリー・PLgel・MIXED-C・5μm、溶媒;クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。表17に、同定結果、平均分子量、ならびに凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、収率を示す。

【0252】

【表17】

P. Jessenii P161株

菌体乾燥重量	650 mg/L
ポリマー乾燥重量	410 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	63%
ポリマー分子量	Mn=4.9×10 ⁴ Mw=9.2×10 ⁴
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ古草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサ酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸	100%

【0253】表17の結果から、菌体から抽出・回収されたポリマーは、PHAモノマーユニットとして、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸に由来するモノマーユニットのみを含むことが確認される。

【0254】(実施例D-5) H45株により産生されたPHPVについて、核磁気共鳴装置 (FT-NMR: Bruker DPX400) を用いて、以下の条件で

¹H-NMRスペクトル測定結果

分析した。測定核種: ¹H, ¹³C、使用溶媒: 重クロロホルム (TMS入り)。その測定結果を、図10に¹H-NMRスペクトル測定結果、表18にその帰属を、図11に¹³C-NMRスペクトル測定結果、表19にその帰属をそれぞれ示す。

【0255】

【表18】

共鳴周波数: 400 MHz

δ値 (ppm)	帰属
0.9~1.7	ブロードピーク → 不純物
1.9	m; 2H, -CH ₂ → d
2.4~2.6	m; 4H, -CH ₂ 2個 → b, e
5.2~5.3	m; 1H, -OCH → c
6.9~7.0	m; 3H, ベンゼン環のプロトン → h, i, j
7.1	m; 2H, ベンゼン環のプロトン → g, k
7.3	s; 溶媒 (CDCl ₃)

m: multiplet, s: singlet

【0256】

【表19】

¹³C-NMRスペクトル測定結果

共鳴周波数: 100 MHz

δ値 (ppm)	帰属
31.8	-CH ₂ → d
35.8	-CH ₂ → e
39.4	-CH ₂ → b
70.9	-CH → c
77.1~77.7	溶媒 (CDCl ₃)
126.5	ベンゼン環の-CH → i
128.7~128.9	ベンゼン環の-CH → g, h, j, k
141.3	ベンゼン環のC → f
169.7	カルボニル基-C=O → a

【0257】この測定結果からも、菌体から抽出・回収されたポリマーは、PHAモノマーユニットとして、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸に由来するモノマーユニットのみを含んでなる、ポリ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸であることが判る。

E: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(19)の5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(FPVA)を原料とする、式(7)で表される3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(HFPVA)に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート: ポリ-3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(PHFPV)の製造に適用した一例を示す。

【0258】(実施例E-1) まず、Macromolecules, 29, 1762-1766 (1996) 及び同, 27, 45-49 (1994) の方法に従って、グリニャール反応により基質であるFPVAを合成した。即ち、5-ブプロモ吉草酸を無水テトラヒドロ

フラン (THF) に溶解させ、-20℃、アルゴン雰囲気下で3M メチルマグネシウムクロリドTHF溶液を滴下しながら加えた。約15分間攪拌した後、1-ブプロモ-4-フルオロベンゼンとマグネシウムのTHF溶液を更に滴下し、0.1M Li₂CuCl₄のTHF溶液を加えた(温度は-20℃に保持)。この反応液を室温まで戻し、更に一晩攪拌した。その後、溶液を氷冷した20%硫酸水溶液に注加し、攪拌して、水層を採取して食塩で飽和し、エーテルで抽出した。更に抽出液を50gの水酸化カリウムを加えた100mLの脱イオン水で抽出した後、20%硫酸水溶液で酸性化して、沈殿部分を回収した。

【0259】この沈殿部分を核磁気共鳴装置 (FT-NMR: Bruker DPX400) を用いて、以下の条件で分析した。測定核種: ¹H, ¹³C、使用溶媒: 重クロロホルム (TMS入り)。その結果を図13及び表20に示す。

【0260】

【表20】

化学シフト/ ppm	type	帰属結果
1.67	m	c, d
2.39	t	b
2.62	t	e
6.97	t	h, j
7.12	t	g, k
10.7	broad	COOH

【0261】(実施例E-2) 酵母エキス (Difco 社製) 0.5%、FPVA 0.1% とを含むM9培地200mlにH45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0262】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃

縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置 (GC-MS, 島津QP-5050, EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果を表21に示す。

【0263】

【表21】

P. cichorii H45株

菌体乾燥重量	1310mg/L
ポリマー乾燥重量	270 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	21%
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサ酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-	
5-(4-フルオロフェニル) 吉草酸	100%

【0264】(実施例E-3) 酵母エキス (Difco 社製) 0.5%、FPVA0.1%とを含むM9培地200mlにP91株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、FPVA0.1%を含む、窒素源 (NH₄Cl) を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0265】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを

抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置 (GC-MS, 島津QP-5050、EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果を表22に示す。

【0266】

【表22】

P. putida P91株

菌体乾燥重量	430mg/L
ポリマー乾燥重量	17 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	4%
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサ酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-	
5-(4-フルオロフェニル) 吉草酸	100%

【0267】(実施例E-4) 酵母エキス (Difco

社製) 0.5%、FPVA0.1%とを含むM9培地2

00mlにP161株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、FPVA0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁し、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0268】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィ

ルターでろ過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果を表23に示す。

【0269】

【表23】

P. jessenii P161株

菌体乾燥重量	780mg/L
ポリマー乾燥重量	330mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	42%
モノマーユニット組成(エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサ酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-	
5-(4-フルオロフェニル)吉草酸	100%

【0270】(実施例E-5) H45株由来のPHFPVについて、核磁気共鳴装置(FT-NMR: Bruker DPX400)を用いて、以下の条件で分析した。測定核種: ¹H, ¹³C、使用溶媒: 重クロロホルム

(TMS入り)。その結果を、図14、表24、図15、表25に示す。

【0271】

【表24】

¹H-NMRスペクトル測定結果

共鳴周波数: 400MHz

δ値(ppm)	帰属
0.9~1.7	ブロードピーク → 不純物
1.8~1.9	m; 2H, -CH ₂ → d
2.4~2.6	m; 4H, -CH ₂ 2個 → b, e
5.2~5.3	m; 1H, -OCH → c
6.9~7.0	t; 2H, ベンゼン環のオルト位プロトン → h, j
7.1	t; 2H, ベンゼン環のメタ位プロトン → g, k
7.3	s; 溶媒(CDCl ₃)

m: multiplet

t: triplet

s: singlet

【0272】

【表25】

¹³C-NMRスペクトル測定結果

共鳴周波数: 100 MHz

δ値 (ppm)	帰属
31.0	-CH ₂ → d
35.9	-CH ₂ → e
39.4	-CH ₂ → b
70.5	-CH → c
77.1~77.7	溶媒 (CDCl ₃)
115.5, 115.7	ベンゼン環のオルト位-CH → h, i
130.0	ベンゼン環のメタ位-CH → g, k
136.3	ベンゼン環パラ位のC → f
160.5, 163.0	F置換位の-C → j
169.7	カルボニル基-C=O → a

【0273】F: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(20)の4-シクロヘキシル酪酸(CHBA)を原料とする、式(8)で表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸(HCHBA)に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造に適用した一例を示す。

【0274】(実施例F-1) YN2株による3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを含むPHAの生産(一段階培養)

酵母エキス0.1%を含むM9寒天培地上のYN2株のコロニーを、酵母エキス0.5%、4-シクロヘキシル酪酸0.1%を含むM9液体培地(200 mL)に接種し、30℃で培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0275】この凍結乾燥ペレットを秤量した後、100 mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を0.45 μmのフィルターでろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、ポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量した。表26に、凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、ならびに収率を示す。

【0276】

【表26】

CDW	PDW	収率
1100	225	20.5

【0277】CDW: 乾燥菌体重量 (mg/L)、

PDW: 乾燥ポリマー重量 (mg/L)、

収率: PDW/CDW (%)

上で述べた従来の報告例(表2)では、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを含むPHAの収量は、培養液1 Lあたり89.1 mgであったが、本実施例の結果は、その約2.5倍に上る収量を得ることができている。また、乾燥菌体当たりの収率自体も、大幅な向上がなされている。

【0278】得られたPHAの組成は以下のようにして

分析した。すなわち、約10 mgのPHAを25 mL容量型フラスコに入れ、クロロホルム2 mLに溶解させ、3%硫酸を含むメタノール溶液2 mLを加えて、100℃で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、脱イオン水10 mLを加えて激しく10分間振とうした後に、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した後、このクロロホルム層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)にかけて、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、PHAモノマーユニットとしては、98%が式(8)で表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸のユニットであり、2%が3-ヒドロキシ酪酸のユニットであった。また、シクロヘキシルメタノールが若干量混在していた。

【0279】以上の結果より、本発明の製造方法により、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを非常に高い割合で含むPHAが得られることがわかる。本発明の方法における酵母エキス添加の効果が確認された。加えて、培養液当たりの収量、乾燥菌体当たりの収率の十分に向上しており、本発明の製造方法は、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットの含有率の高さ、収量の高さの双方において、高効率な製造方法であることが確認される。

【0280】H45株による3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを含むPHAの生産(一段階培養)

酵母エキス0.1%を含むM9寒天培地上のH45株のコロニーを、酵母エキス0.5%、4-シクロヘキシル酪酸0.1%を含むM9液体培地(200 mL)に接種し、30℃で培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0281】この凍結乾燥ペレットを秤量した後、100 mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を0.45 μmのフィルターでろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、ポリマーを得た。このポ

リマーを室温で減圧乾燥し、秤量した。表27に、凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、ならびに収率を示す。

【0282】

【表27】

CDW	PDW	収率
800	120	15.0

【0283】CDW：乾燥菌体重量 (mg/L)、
PDW：乾燥ポリマー重量 (mg/L)、
収率：PDW/CDW (%)

上で述べた従来の報告例 (表2) では、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸由来のユニットを含むPHAの収量は、培養液1Lあたり89.1 mgであったが、本実施例の結果は、その約1.3倍に上る収量を得ることができている。また、乾燥菌体当たりの収率自体も、向上がなされている。

【0284】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。すなわち、約10mgのPHAを25mL容量型フラスコに入れ、クロロホルム2mLに溶解させ、3%硫酸を含むメタノール溶液2mLを加えて、100℃で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、脱イオン水10mLを加えて激しく10分間振とうした後に、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した後、このクロロホルム層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS, 島津QP-5050, EI法) にかけて、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、PHAモノマーユニットとしては、97%が式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットであり、3%が3-ヒドロキシ酪酸に由来するユニットであった。また、シクロヘキシルメタノールが若干量混在していた。

【0285】以上の結果より、H45株においても、本発明の製造方法により、式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットを非常に高い割合で含むPHAが得られることがわかる。

【0286】P161株による3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを含むPHAの生産 (一段階培養)

酵母エキス0.1%を含むM9寒天培地上のP161株のコロニーを、酵母エキス0.5%、4-シクロヘキシル酪酸0.1%を含むM9液体培地 (200mL) に植菌し、30℃で培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0287】この凍結乾燥ペレットを秤量した後、100mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を0.45μmのフィルターでろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を

冷メタノール中で再沈殿させ、ポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量した。表28に、凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、ならびに収率を示す。

【0288】

【表28】

CDW	PDW	収率
750	130	17.3

【0289】CDW：乾燥菌体重量 (mg/L)、
PDW：乾燥ポリマー重量 (mg/L)、
収率：PDW/CDW (%)

上で述べた従来の報告例 (表2) では、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットを含むPHAの収量は、培養液1Lあたり89.1 mgであったが、本実施例の結果は、その約1.5倍に上る収量を得ることができている。また、乾燥菌体当たりの収率自体も、向上がなされている。

【0290】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。すなわち、約10mgのPHAを25mL容量型フラスコに入れ、クロロホルム2mLに溶解させ、3%硫酸を含むメタノール溶液2mLを加えて、100℃で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、脱イオン水10mLを加えて激しく10分間振とうした後に、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した後、このクロロホルム層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS, 島津QP-5050, EI法) にかけて、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、PHAモノマーユニットとしては、94%が式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットであり、6%が3-ヒドロキシ酪酸のユニットであった。また、シクロヘキシルメタノールが若干量混在していた。

【0291】以上の結果より、P161株においても、本発明の製造方法により、式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸由来のユニットを非常に高い割合で含むPHAが得られることがわかる。

【0292】(実施例F-2) YN2株による3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを含むPHAの生産 (二段階培養)

酵母エキス0.1%を含むM9寒天培地上のYN2株のコロニーを、酵母エキス0.5%、4-シクロヘキシル酪酸0.1%を含むM9液体培地 (200mL) に植菌し、30℃で培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、M9培地よりNaCl及びNH₄Clを除いた成分の溶液に4-シクロヘキシル酪酸0.1%を加えた培地中に移し、30℃で21時間培養した。得られた菌体をメタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0293】この凍結乾燥ペレットを秤量した後、実施

例F-1と同様の方法でポリマーを回収した。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量した。表29に、凍結乾燥ベレット、回収ポリマーの収量、ならびに収率を示す。

【0294】

【表29】

CDW	PDW	収率
1100	285	25.9

【0295】CDW：乾燥菌体重量 (mg/L)、

PDW：乾燥ポリマー重量 (mg/L)、

収率：PDW/CDW (%)

上で述べた従来の報告例 (表2) では、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸由来のユニットを含むPHAの収量は、培養液1Lあたり89.1 mgであったが、本実施例の結果は、その約3.2倍に上る収量を得ることができている。また、乾燥菌体当たりの収率自体も、大幅な向上がなされている。

【0296】得られたPHAの組成を実施例F-1と同様の方法で評価した。その結果、PHAモノマーユニットとしては、99%が式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットであり、1%が3-ヒドロキシ酪酸のユニットであった。また、シクロヘキシルメタノールが若干量混在していた。

【0297】さらに得られたポリマーの分子量をGPC (東ソー HLC-8020、カラム：ポリマーラボラトリー PLgel MIXED-C (5 μ m)、溶媒：クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価したところ、 $M_n=490000$ 、 $M_w=1000000$ であった。

【0298】以上の結果より、本発明の製造方法により、式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットを非常に高い割合で含むPHAが得られることがわかる。本発明の方法における酵母エキス添加の効果が確認された。加えて、培養液当たりの収量、乾燥菌体当たりの収率の十分に向上してお

り、本発明の製造方法は、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットの含有率の高さ、収量の高さの双方において、高効率な製造方法であることが確認される。

【0299】本実施例と実施例F-1を対比することで、予め酵母エキスおよび4-シクロヘキシル酪酸を含む無機塩液体培地で培養した後、集菌した微生物を酵母エキス添加しない無機塩培地中で培養するという手法を探っても、得られるPHAは、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを非常に高い割合で含むという効果が達成されることが確認される。

【0300】(実施例F-3)

3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットからなるPHAの精製及びそのNMR分析
実施例F-2で得られたポリマーから、混入しているPHB (ポリ 3-ヒドロキシ酪酸) 成分及びシクロヘキシルメタノールと考えられる成分を除去するため、以下のような精製操作を行った。

【0301】すなわち、ポリマーをアセトン中に懸濁し、60℃で24時間抽出した。遠心分離により上澄を回収し、沈殿した部分は再度アセトンにより抽出操作を行った。この操作を合計5回繰り返し、上澄を集めてエバポレーターにより濃縮乾固させた。乾固した試料を少量のクロロホルムに溶解させ、冷メタノール中で再沈殿させた。本操作を3回繰り返し、得られたポリマーを減圧乾燥した。得られた乾燥ポリマーを秤量したところ、281 mgであった。

【0302】このポリマーの ^1H -NMR及び ^{13}C -NMRの測定を行った (FT-NMR: Bruker DPX400、使用溶媒：重クロロホルム (TMS入り))。 ^1H -NMRのチャートを図16に、その帰属を表30に、 ^{13}C -NMRのチャートを図17に、その帰属を表31にそれぞれ示す。

【0303】

【表30】

^1H スペクトル測定結果

共鳴周波数：400MHz

δ 値 (ppm)	帰 属
0.9~1.8	m; 11H, -CH ₂ 5個 → f, g, h, i, j -CH → e
1.5~1.7	m; 2H, -CH ₂ → d
2.5~2.6	dd; 2H, -CH ₂ → b (ヘキシル基との遠隔H-Hスピン結合のためさらに分裂)
5.2~5.3	m; 1H, -OCH → c

d: doublet, dd: double doublet

【0304】

【表31】

¹³Cスペクトル測定結果

共鳴周波数: 100 MHz

δ 値 (ppm)	帰 属
26.4~34.3	ヘキシル基の-CH ₂ , -CH→ c~j
40.1	-CH ₂ → d
41.9	-CH ₂ → b
69.3	-CH → c
77.1~77.7	溶媒 (CDCl ₃)
169.8	カルボニル基-C=O → a

【0305】この評価により、上記の精製操作により、混入しているPHB（ポリ 3-ヒドロキシ酪酸）成分及びシクロヘキシルメタノールと考えられる成分が除かれ、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットからなるPHAが回収されたと判断される。

G：本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、7-フェノキシヘプタン酸（PxHpA）を原料とする、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸（3HPxHp）ならびに3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸（3HPxV）に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート：3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸（3HPxHp）ならびに3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸（3HPxV）からなるコポリマーの製造に適用した一例を示す。

【0306】（実施例G-1）YN2株によるP（HPxV/HPxHp）ポリマーの生産（酵母エキス段階培養）

酵母エキス（Difco社製）0.5%、7-フェノキシヘプタン酸（PxHpA）0.1%とを含むM9培地200mlにYN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。64時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0307】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温（23℃）で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これ

を秤量した。

【0308】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC；東ソー・HLC-8020、カラム；ポリマーラボラトリー・PLGel 1・MIXED-C・5μm、溶媒；クロロホルム、ポリスチレン換算分子量）により測定した。

【0309】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%（v/v）含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置（GC-MS、島津QP-5050、カラム：DB-WAXETR（J&W社製）、EI法）で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表32に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸（3HPxV）メチルエステル、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸（3HPxHp）メチルエステルのマススペクトルを、図18及び図19にそれぞれ示す。

【0310】この結果から、YN2株により、7-フェノキシヘプタン酸を基質として3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸（3HPxV）及び3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸（3HPxHp）の2ユニットのみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0311】

【表32】

菌体乾燥重量 (mg/L)	1295
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	350
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	3.9
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	8.1
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	60.0
3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (%)	40.0

【0312】(実施例G-2) H45株によるP(HPxV/HPxHp)ポリマーの生産(酵母エキス一段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、7-フェノキシヘプタン酸(PxHpA)0.1%とを含むM9培地200mlにH45株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。64時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0313】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0314】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HLC-8020、カラム;ポリマーラボラトリー・PLgel MIXED-C \cdot 5 μ m、溶媒;クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0315】得られたポリマーのユニット組成は以下の

菌体乾燥重量 (mg/L)	1070
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	235
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	2.9
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	5.7
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	27.9
3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (%)	72.1

【0318】H: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、8-フェノキシオクタン酸(PxOA)を原料とする、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)、3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HPxO)の三種に由来するモノ

ようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム:DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAMonomerユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表33に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)メチルエステル、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HPxHp)メチルエステルのマススペクトルを、図20及び図21にそれぞれ示す。

【0316】この結果から、H45株により、7-フェノキシヘプタン酸を基質として3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)及び3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HPxHp)の2ユニットのみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0317】

【表33】

マーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート: 3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)ならびに3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HPxO)からなるコポリマーの製造に適用した一例を示す。

【0319】(実施例H-1) YN2株によるP(H PxB/HPxHx/HPxO)ポリマーの生産(酵母エキス一段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、8-フェノキシオクタン酸(PxOA)0.1%とを含むM9培地200mlにYN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0320】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0321】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HLC-8020、カラム;ポリマーラボラトリー・PLgel・MIXED-C・5μm、溶媒;クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0322】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml

及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム:DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表34に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)メチルエステル、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)メチルエステル、3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HPxO)メチルエステルのマススペクトルを図22、図23及び図24に示す。

【0323】この結果から、YN2株により、8-フェノキシオクタン酸を基質として3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)及び3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HPxO)の3ユニットのみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0324】

【表34】

菌体乾燥重量 (mg/L)	1315
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	415
数平均分子量 (Mn) × 10 ⁴	2.5
重量平均分子量 (Mw) × 10 ⁴	5.5
3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸 (%)	2.2
3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸 (%)	68.7
3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸 (%)	29.1

【0325】(実施例H-2) H45株によるP(H PxB/HPxHx/HPxO)ポリマーの生産(酵母エキス一段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、8-フェノキシオクタン酸(PxOA)0.1%とを含むM9培地200mlにH45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0326】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これ

を秤量した。

【0327】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HLC-8020、カラム;ポリマーラボラトリー・PLgel・MIXED-C・5μm、溶媒;クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0328】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム:DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行っ

た。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表35に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸 (3HPxB) メチルエステル、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸 (3HPxHx) メチルエステル、3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸 (3HPxO) メチルエステルのマススペクトルを図25、図26及び図27に示す。

【0329】この結果から、H45株により、8-フェ

ノキシオクタン酸を基質として3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸 (3HPxB) 3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸 (3HPxHx) 及び3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸 (3HPxO) の3ユニットのみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0330】

【表35】

菌体乾燥重量 (mg/L)	990
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	225
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	1.8
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	4.3
3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸 (%)	2.4
3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸 (%)	73.2
3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸 (%)	24.4

【0331】I：本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、11-フェノキシウンデカン酸 (PxUDA) を原料とする、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV)、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp)、3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (3HPxN) の三種に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート：3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV)、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) ならびに3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (3HPxN) からなるコポリマーの製造に適用した一例を示す。

【0332】(実施例I-1) YN2株によるP(HPxN/HPxHp/HPxV) ポリマーの生産 (酵母エキス段階培養)

酵母エキス (Difco社製) 0.5%、11-フェノキシウンデカン酸 (PxUDA) 0.1%とを含むM9培地200mlにYN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。64時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0333】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温 (23℃) で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0334】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー・HL

C-8020、カラム; ポリマーラボラトリー・PLgel 1・MIXED-C・5 μ m、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算分子量) により測定した。

【0335】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3% (v/v) 含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR (J&W社製)、EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表36に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) メチルエステル、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) メチルエステル及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (3HPxN) メチルエステルのマススペクトルを図28、図29及び図30に示す。

【0336】この結果から、YN2株により、11-フェノキシウンデカン酸を基質として3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV)、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) 及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (3HPxN) の3つのユニットのみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0337】

【表36】

菌体乾燥重量 (mg/L)	1510
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	385
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	1.8
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	3.8
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	32.0
3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (%)	65.6
3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (%)	2.4

【0338】(実施例1-2) H45株によるP(H P \times N/HP \times Hp/HP \times V)ポリマーの生産(酵母エキス段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、11-フェノキシウンデカン酸(P \times UDA)0.1%とを含むM9培地200mlにH45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。64時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0339】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0340】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム; ポリマーラボラトリー・PLGel MIXED-C \cdot 5 μ m、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0341】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml

及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAMonomerユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表37に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HP \times V)メチルエステル、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HP \times Hp)メチルエステル及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸(3HP \times N)メチルエステルのマススペクトルを図31、図32及び図33に示す。

【0342】この結果から、H45株により、11-フェノキシウンデカン酸を基質として3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HP \times V)、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HP \times Hp)及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸(3HP \times N)の3つのユニットのみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0343】

【表37】

菌体乾燥重量 (mg/L)	1015
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	120
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	2.2
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	4.5
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	45.8
3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (%)	47.8
3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (%)	6.4

【0344】J: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、6-フェニルヘキサン酸(PH \times A)を原料とする、3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPH \times)に由来するモノマーユニットからなる

ポリヒドロキシアルカノエート: ポリ-3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPH \times)の製造、あるいは、3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPH \times)と3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(3HP

B)に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート：3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPHx)と3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(3HPB)からなるコポリマーの製造に適用した一例を示す。

【0345】(実施例J-1) YN2株によるPHPHxポリマーの生産(酵母エキス段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、6-フェニルヘキサン酸(PHxA)0.1%とを含むM9培地200mlにYN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。27時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0346】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0347】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HLC-8020、カラム;ポリマーラボラトリー・PLg

el・MIXED-C・5μm、溶媒;クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0348】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム:DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表38に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPHx)メチルエステルのマススペクトルを図34に示す。

【0349】この結果から、YN2株により、6-フェニルヘキサン酸を基質として3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPHx)のみからなるPHAポリマーを生産し得ることが示された。

【0350】

【表38】

菌体乾燥重量(mg/L)	1095
ポリマー乾燥重量(mg/L)	90
数平均分子量(Mn) × 10 ⁴	6.8
重量平均分子量(Mw) × 10 ⁴	17.9
3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(%)	100.0

【0351】(実施例J-2) H45株によるP(HPHx/HPB)ポリマーの生産(酵母エキス段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、6-フェニルヘキサン酸(PHxA)0.1%とを含むM9培地200mlにH45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。27時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0352】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0353】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HLC

C-8020、カラム;ポリマーラボラトリー・PLg el・MIXED-C・5μm、溶媒;クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0354】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム:DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表39に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(3HPB)メチルエステル及び3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPHx)メチルエステルのマススペクトルを図35及び図36に示す。

【0355】この結果から、H45株により、6-フェニルヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(3HPB)と3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPHx)のみからなるPHAコポリ

マーを生産し得ることが示された。

【0356】

【表39】

菌体乾燥重量 (mg/L)	93.5
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	9.0
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	6.9
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	15.5
3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸 (%)	1.7
3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (%)	98.7

【0357】K：本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、5-フェニル吉草酸(PVA)及び5-フェノキシ吉草酸(PxVA)の二種を原料とする、対応する3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)と3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート：3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)と3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)からなるコポリマーの製造に適用した一例を示す。

【0358】(実施例K-1) YN2株によるP(HPV/HPxV)ポリマーの生産(酵母エキス一段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、5-フェニル吉草酸(PVA)0.05%及び5-フェノキシ吉草酸(PxVA)0.05%とを含むM9培地200mlにYN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0359】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0360】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミ

エーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム; ポリマーラボラトリー・PLGel-MIXED-C・5 μ m、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0361】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表40に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)メチルエステル及び3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)メチルエステルのマススペクトルを図37及び図38に示す。

【0362】この結果から、YN2株により、5-フェニル吉草酸及び5-フェノキシ吉草酸を基質として、対応する3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)と3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)のみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0363】

【表40】

菌体乾燥重量 (mg/L)	1300
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	330
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	5.0
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	10.8
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (%)	62.3
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	37.7

【0364】(実施例K-2) H45株によるP(HPV/HPxV)ポリマーの生産(酵母エキス一段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、5-フェニル吉草酸(PVA)0.05%及び5-フェノキシ吉草酸(PxVA)0.05%を含むM9培地200mlにH45株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0365】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0366】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HLC-8020、カラム;ポリマーラボラトリー・PLgel 1-MIXED-C \cdot 5 μ m、溶媒;クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0367】得られたポリマーのユニット組成は以下の

菌体乾燥重量 (mg/L)	1050
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	166
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	3.6
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	7.7
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (%)	76.4
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	23.6

【0370】

【発明の効果】本発明により、微生物を用いて、鎖の末端に、置換または未置換フェニル基、置換または未置換フェノキシ基、置換または未置換シクロヘキシル基の何れかの6員環原子団が置換されている、 ω -置換-直鎖アルカン酸を原料として、対応する ω -置換-3-ヒド

ようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム:DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAMonomerユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表41に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)メチルエステル及び3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)メチルエステルのマススペクトルを図39及び図40に示す。

【0368】この結果から、H45株により、5-フェニル吉草酸及び5-フェノキシ吉草酸を基質として、対応する3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)と3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)のみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0369】

【表41】

ロキシアリカン酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアリカノエートを製造する方法、これら側鎖の末端に6員環原子団を有するポリヒドロキシアリカノエートの選択的な製造に好適な微生物が提供される。本発明の製造方法により、初めて微生物生産が可能となった種々のポリヒドロキシアリカノエートは、酵母エキス

と原料の ω -置換-直鎖アルカン酸を含む無機培地において、例えば、シュドモナス属 (*Pseudomonas* sp.) に属する微生物を培養して、原料の ω -置換-直鎖アルカン酸に作用させることで効率的に製造できるので、生分解性を持つ、機能性ポリマーとして有用

なポリヒドロキシアルカノエートとして、デバイス材料や医療用材料等の各分野への応用が期待できる。

【0371】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CANON INC.

<120> Preparation of Poly-hydroxyalkanoic Acid

<130> 4351008

<160> 1

<170> Microsoft Word

<210> 1

<211> 1501

<212> DNA

<213> *Pseudomonas jessenii* P161 ; FERM P-17445

<400> 1

tgaacgctgg	cggcaggcct	aacacatgca	agtcgagcgg	40
atgacgggag	cttgctcctg	aattcagcgg	cggacgggtg	80
agtaatgcct	aggaatctgc	ctggtagtgg	gggacaacgt	120
ctcgaaaggg	acgctaatac	cgcatacgtc	ctacggggaga	160
aagcagggga	ccttcgggcc	ttgcgtatc	agatgagcct	200
aggtcggatt	agctagttag	tgaggaatg	gctcaccaag	240
gcgacgatcc	gtaactggtc	tgagaggatg	atcagtcaca	280
ctggaactga	gacacgggcc	agactcctac	gggaggcagc	320
agtggggaat	attggacaat	gggcgaaagc	ctgatccagc	360
catgccgcgt	gtgtgaagaa	ggtcttcgga	ttgtaaagca	400
ctttaagttg	ggaggaaggg	cattaaccta	atacgttagt	440
gttttgacgt	taccgacaga	ataagcaccg	gctaactctg	480
tgccagcagc	cgcggttaata	cagagggtgc	aagcgttaat	520
cggaattact	ggcggtaaag	cgcgcgtagg	tggtttgta	560
agttggatgt	gaaagccccg	ggctcaacct	gggaactgca	600
ttcaaaactg	acaagctaga	gtatggtaga	gggtggtgga	640
atttcctgtg	tagcgtgtaa	atgcgtagat	ataggaagga	680
acaccagtgg	cgaaggcgac	cacctggact	gatactgaca	720
ctgaggtgcg	aaagcgtggg	gagcaaacag	gattagatac	760
cctggtagtc	cacgccgtaa	acgatgtcaa	ctagccgttg	800
ggagccttga	gctcttagtg	gcgcagctaa	cgcattaaagt	840
tgaccgcctg	gggagtacgg	ccgcaaggtt	aaaactcaaa	880
tgaattgacg	ggggcccgca	caagcgttgg	agcatgttgt	920
ttaattcgaa	gcaacgcgaa	gaaccttacc	aggccttgac	960
atccaatgaa	ctttccagag	atggatgggt	gccttcggga	1000
acattgagac	aggtgctgca	tggtgtcgt	cagctcgtgt	1040
cgtgagatgt	tgggttaagt	cccgtaacga	gcgcaaccct	1080
tgctccttagt	taccagcacg	taatggtggg	cactctaagg	1120
agactgccgg	tgacaaccg	gagggaagtg	gggatgacgt	1160
caagtcatca	tggcccttac	ggcctgggct	acacacgtgc	1200
tacaatggtc	ggtacagagg	gttgccaagc	cgcgaggtgg	1240
agctaattccc	acaaaaccga	tcgtagtcgg	gacgcagtc	1280
tgcaactcga	ctgcgtgaag	tcggaatcgc	tagtaatcgc	1320
gaatcagaat	gtcgcggtga	atacgttccc	gggccttgta	1360

```

cacaccgccc gtcacacccat gggagtgggt tgcaccagaa 1400
gtagctagtc taaccttcgg gaggacggtt accacggtgt 1440
gattcatgac tggggtgaag tcgtaccaag gtagccgtag 1480
gggaacctgc ggctggatca c 1501

```

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例A-2で得られた、P91株の培養菌体から回収したPHAの¹H-NMRスペクトルを示す。

【図2】実施例B-1で得られた5-フェノキシ吉草酸に関する核磁気共鳴スペクトルの測定結果を示す図である。

【図3】実施例B-2で得られたPHAを構成するモノマーユニットのメチルエステル化物についての分析結果を示す図であり、(a)はGC-MSのトータルイオンクロマトグラフィー(TIC)を、(b)はTICでのメインピークのマススペクトルを示す。

【図4】実施例B-2で得られたPHAに関する核磁気共鳴スペクトルの測定結果を示す図である。

【図5】実施例B-3で得られたPHAを構成するモノマーユニットのメチルエステル化物の分析結果を示す図であり、(a)はTICであり、(b)はTICでのメインピークのマススペクトルである。

【図6】実施例C-1で得られた5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸に関する核磁気共鳴スペクトルの測定結果を示す図である。

【図7】実施例C-2で得られたPHAを構成するモノマーユニットのメチルエステル化物についての分析結果を示す図であり、(a)はGC-MSのトータルイオンクロマトグラフィー(TIC)を、(b)はTICでのメインピークのマススペクトルを示す。

【図8】実施例C-2で得られたPHAに関する核磁気共鳴スペクトルの測定結果を示す図である。

【図9】実施例C-3で得られたPHAを構成するモノマーユニットのメチルエステル化物における分析結果を示す図であり、(a)はTICであり、(b)TICでのメインピークのマススペクトルである。

【図10】実施例D-5における、H45株により産生されたポリ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸の¹H-NMRスペクトル測定結果を示す。

【図11】実施例D-5における、H45株により産生されたポリ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸の¹³C-NMRスペクトル測定結果を示す。

【図12】シュードモナス ジェッセニイ P161株(Pseudomonas jessenii P161; FERM P-17445)の16S rRNAの塩基配列を示す。

【図13】実施例E-1において、原料アルカノエートとして合成した、FPVAの核磁気共鳴スペクトルの測定結果を示す図である。

【図14】実施例E-5において、FPVAを原料として、本発明の製造方法で得られたPHAの¹H-NMRスペクトルのチャートである。

【図15】実施例E-5において、FPVAを原料として、本発明の製造方法で得られたPHAの¹³C-NMRスペクトルのチャートである。

【図16】実施例F-3で精製された、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットからなるPHAの¹H-NMRのチャートである。

【図17】実施例F-3で精製された、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットからなるPHAの¹³C-NMRのチャートである。

【図18】実施例G-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図19】実施例G-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HPxHp)メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図20】実施例G-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図21】実施例G-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HPxHp)メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図22】実施例H-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図23】実施例H-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図24】実施例H-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HPxO)メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図25】実施例H-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図26】実施例H-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図27】実施例H-2で製造されたポリマーから、G

C-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸 (3HPxO) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図28】実施例I-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図29】実施例I-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図30】実施例I-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (3HPxN) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図31】実施例I-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図32】実施例I-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図33】実施例I-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (3HPxN) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図34】実施例J-1で製造されたポリマーから、G

C-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (3HPHx) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図35】実施例J-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸 (3HPB) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図36】実施例J-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (3HPHx) メチルエステルのマススペクトルを示す。

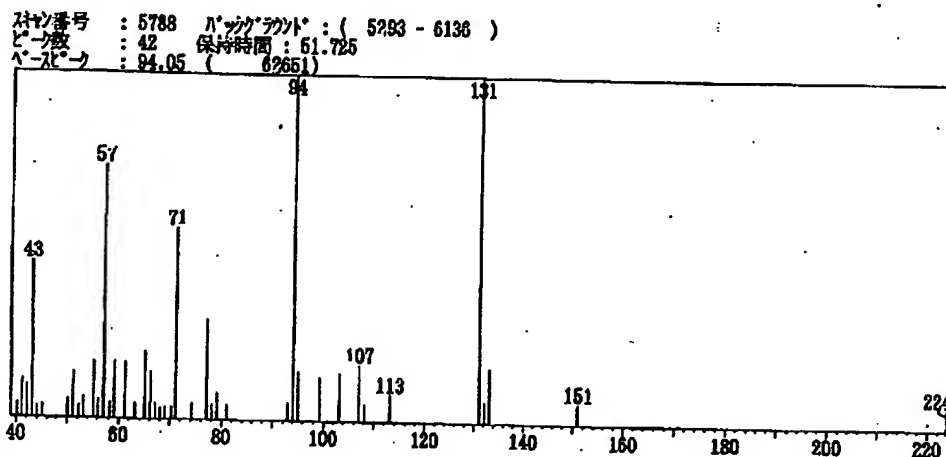
【図37】実施例K-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (3HPV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図38】実施例K-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

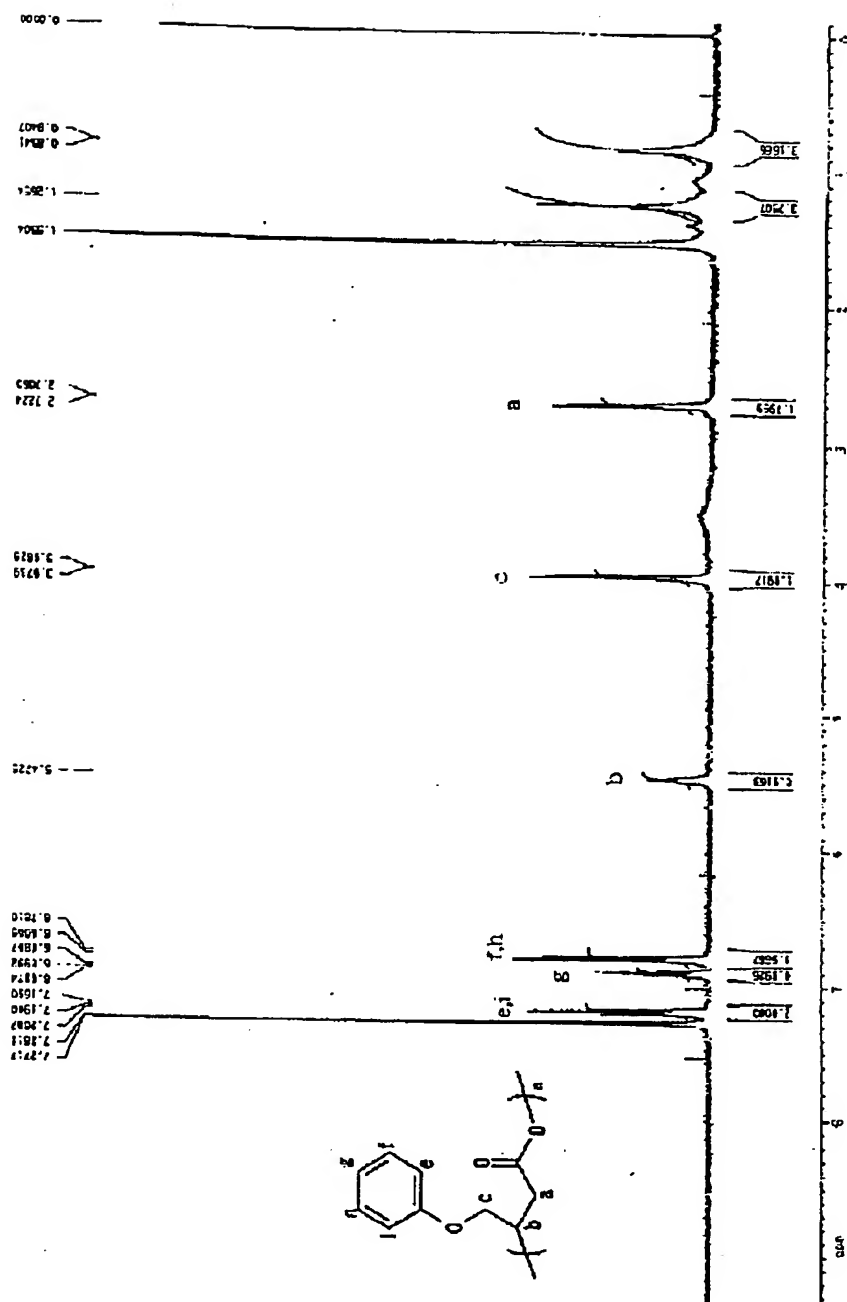
【図39】実施例K-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (3HPV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図40】実施例K-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

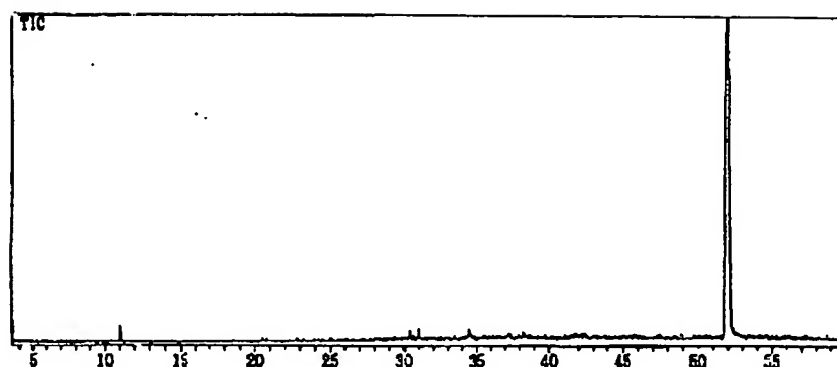
【図18】



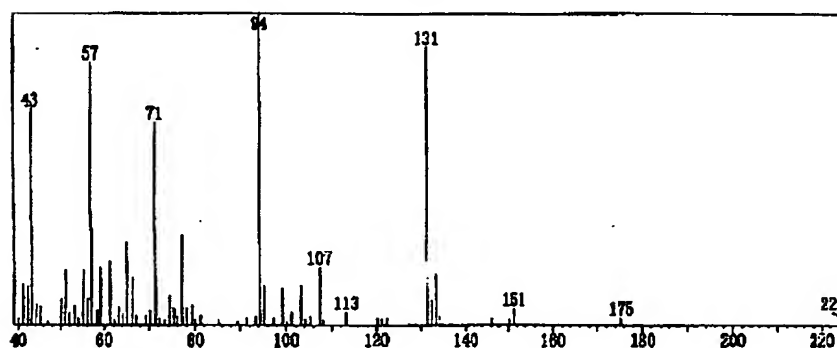
【図1】



【図3】



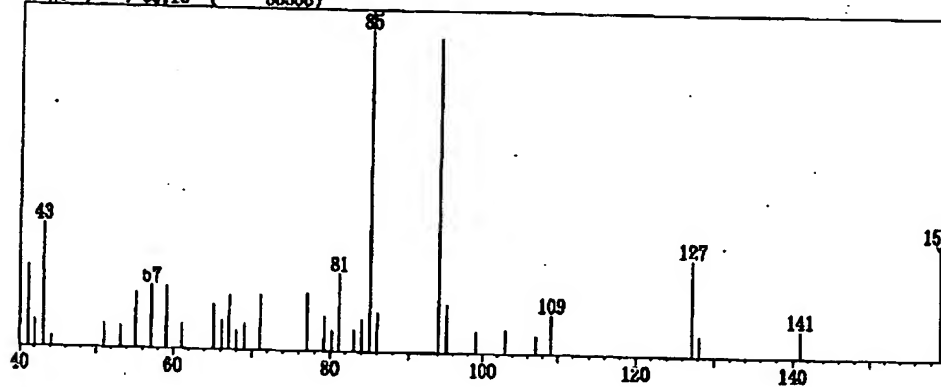
(a)



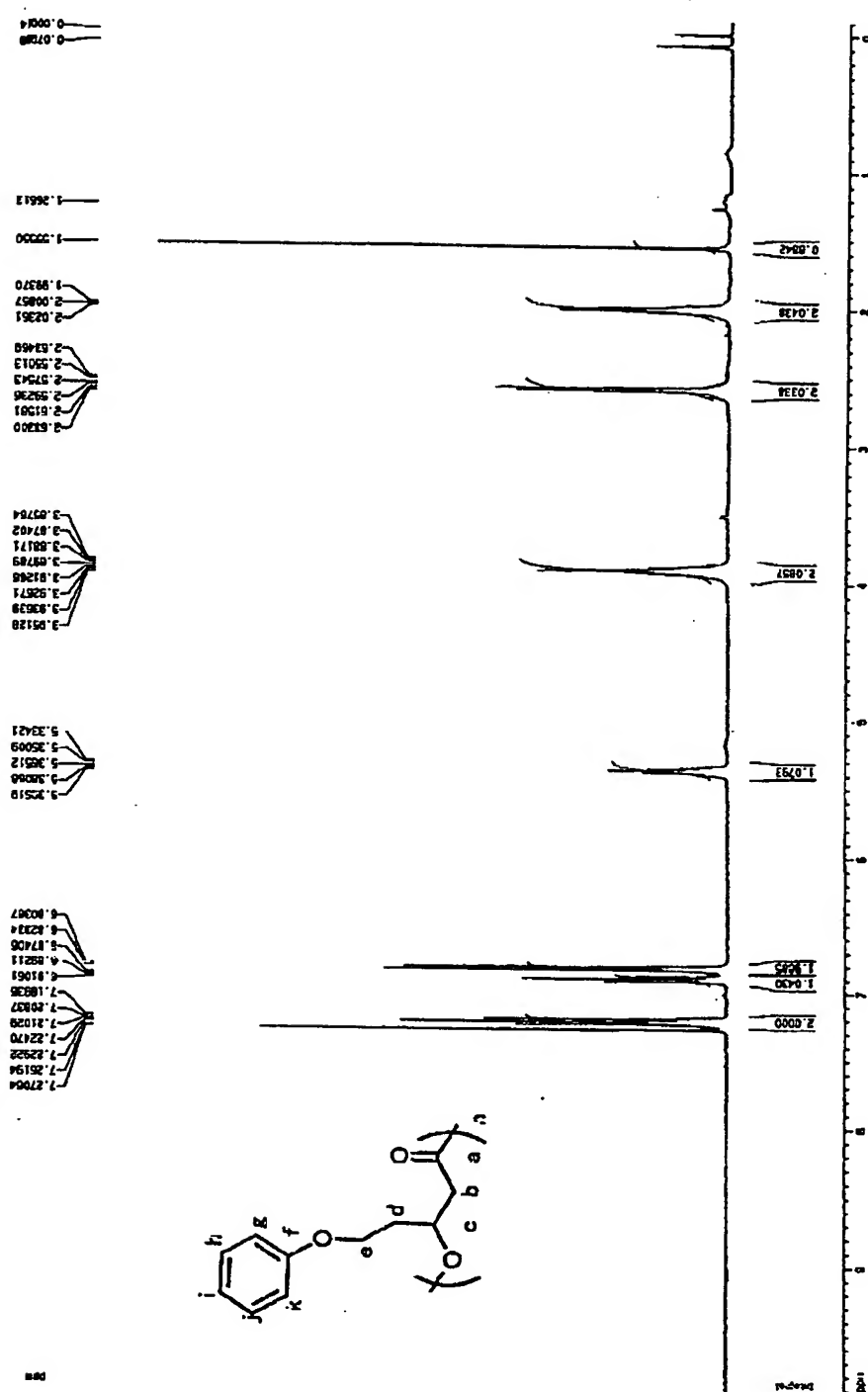
(b)

【図19】

検出番号 : 8336 分子量範囲 : (8904 - 9732)
 ピーク数 : 34 保持時間 : 81.292
 ベースピーク : 85.10 (38358)

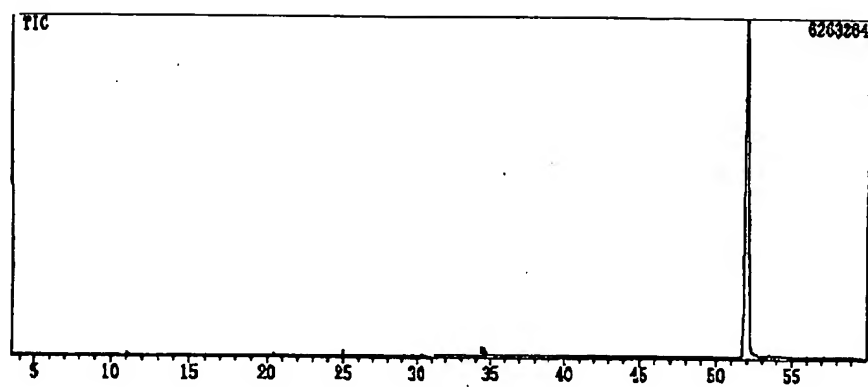


【図4】

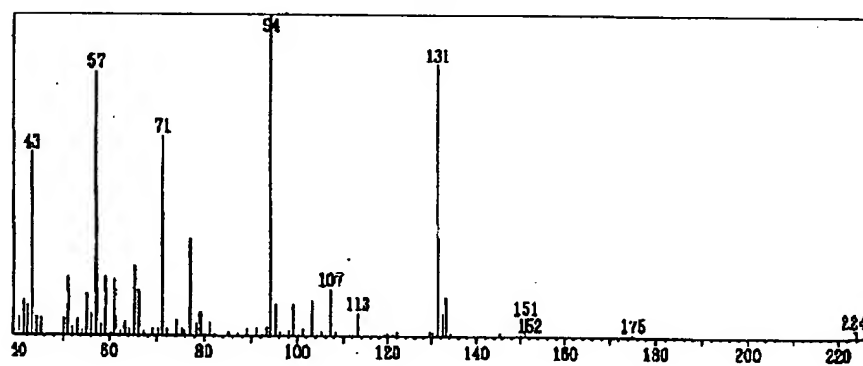


(株) 01-288256 (P2001-288256A)

【図5】



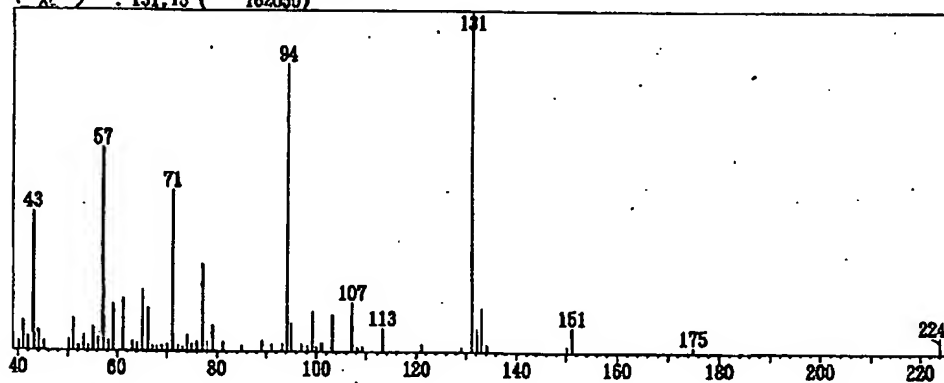
(a)



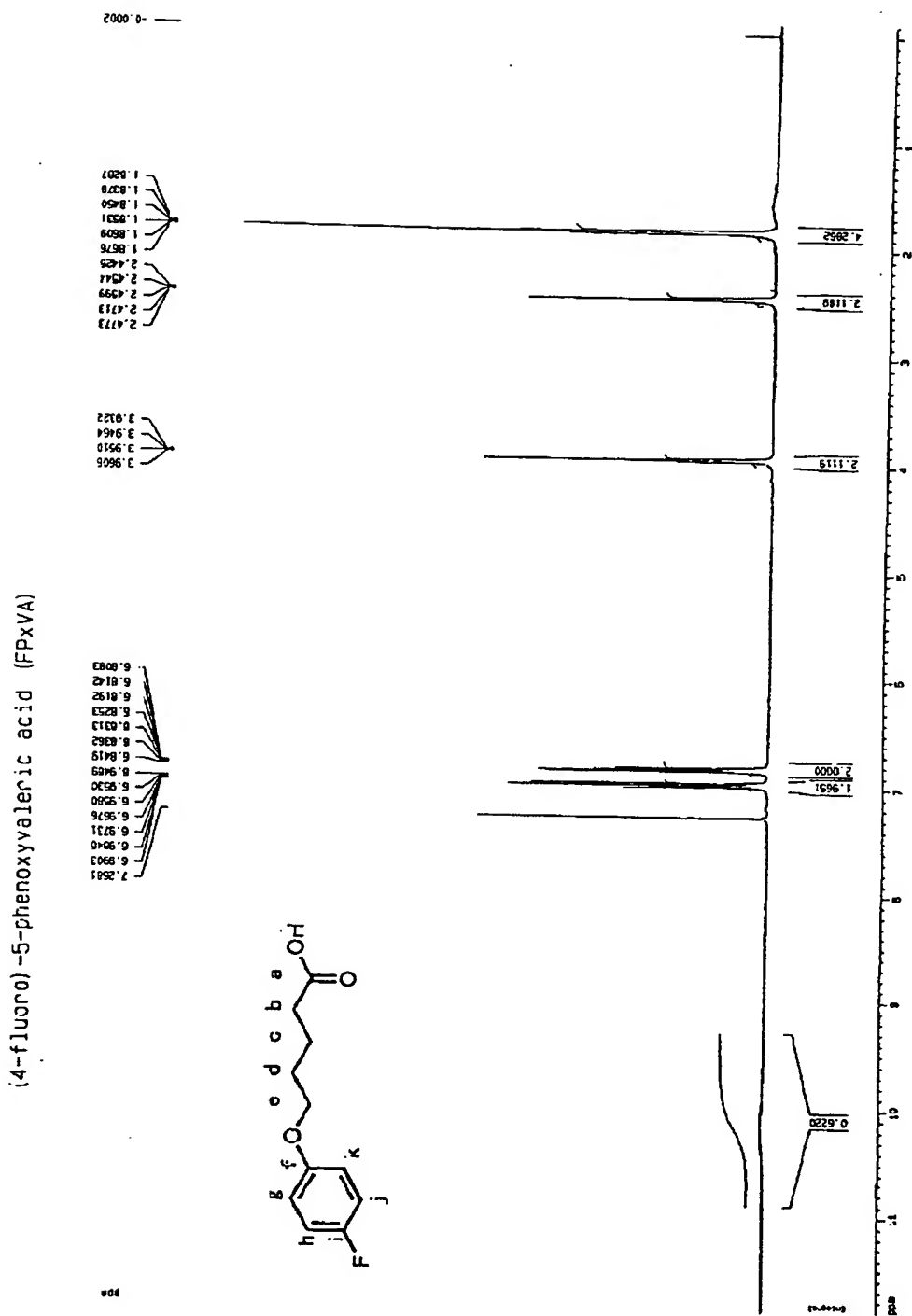
(b)

【図20】

検出番号 : 5790 検出時刻 : (5377 - 6338)
ピーク数 : 61 保持時間 : 51.742
ピーク名 : 131.15 (182050)

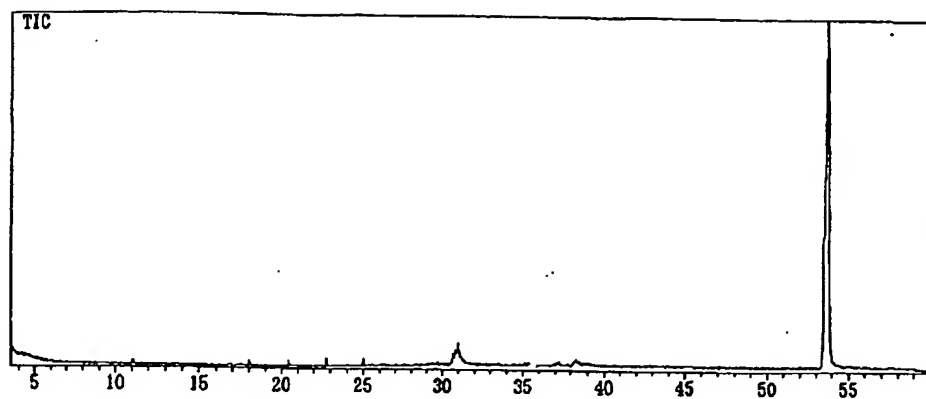


【図6】

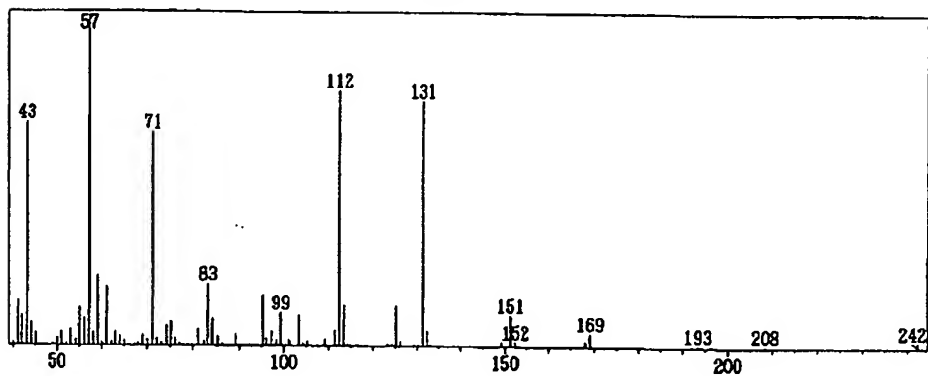


(※3) 101-288256 (P2001-288256A)

【図7】



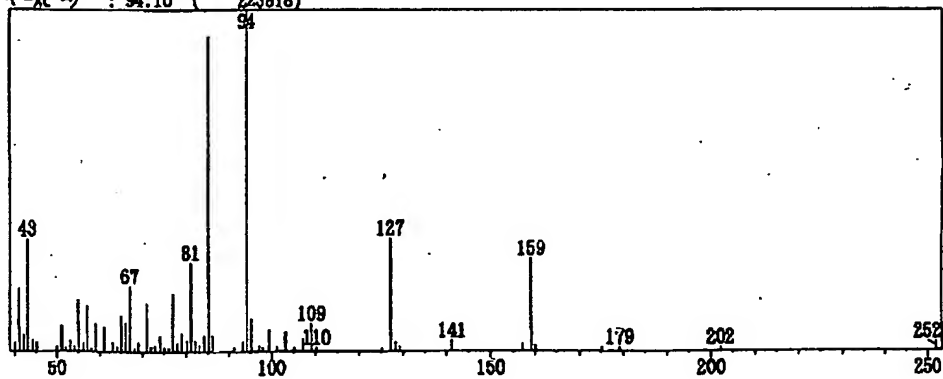
(a)



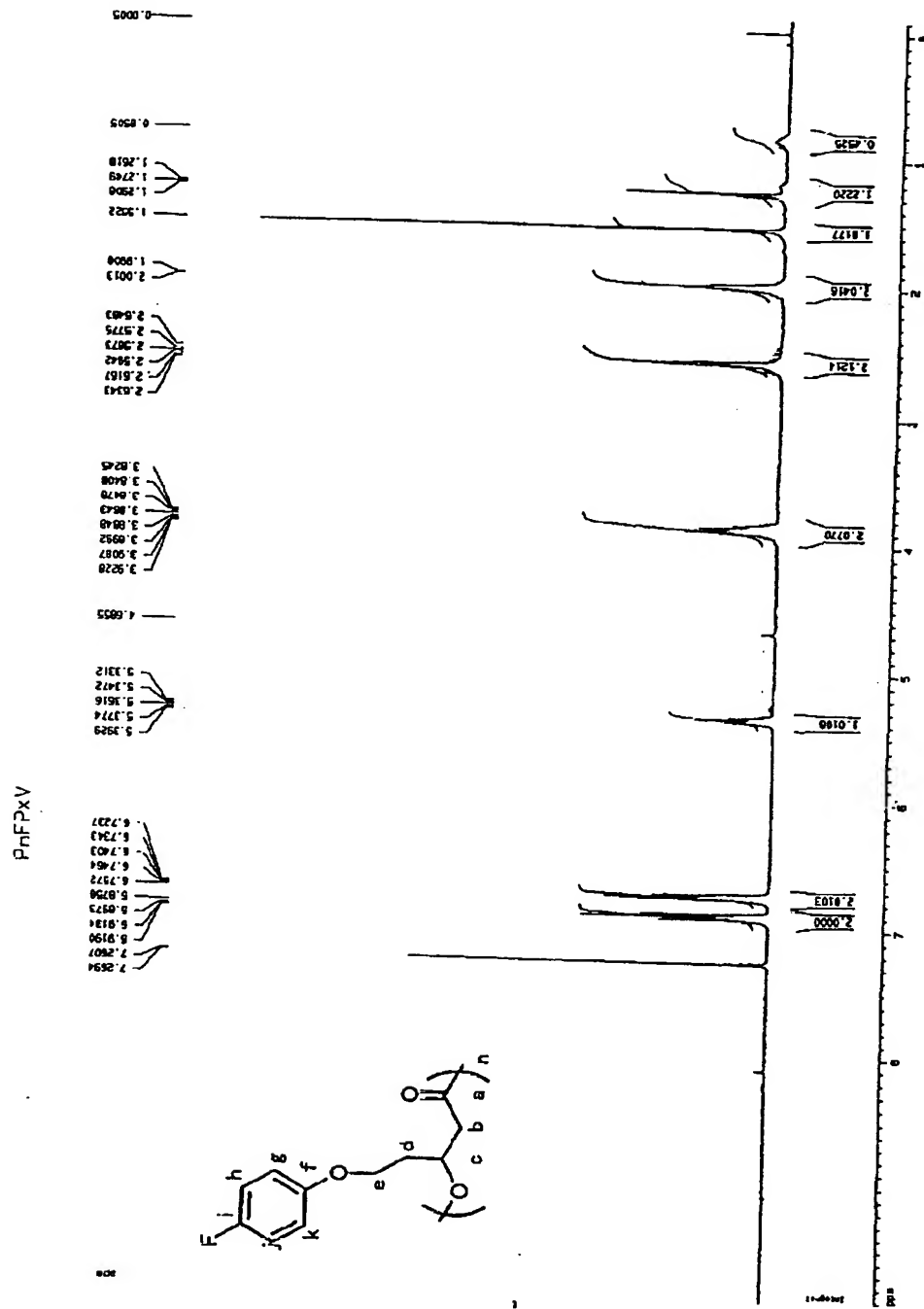
(b)

【図21】

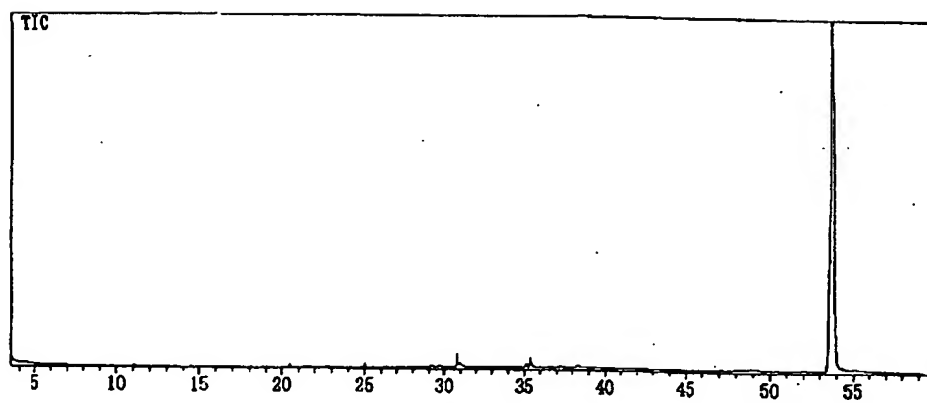
スペクトル番号 : 9351 パターン名 : (8351 - 9812)
 ピーク数 : 65 保持時間 : 81.417
 パーセント : 94.10 (223818)



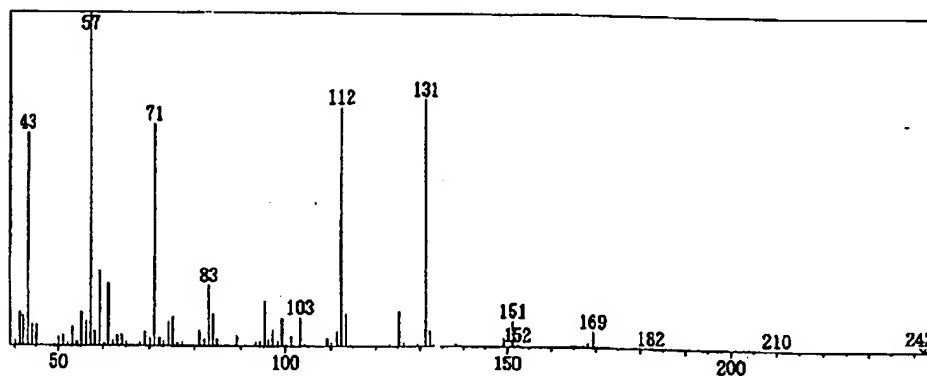
【8】



【図9】

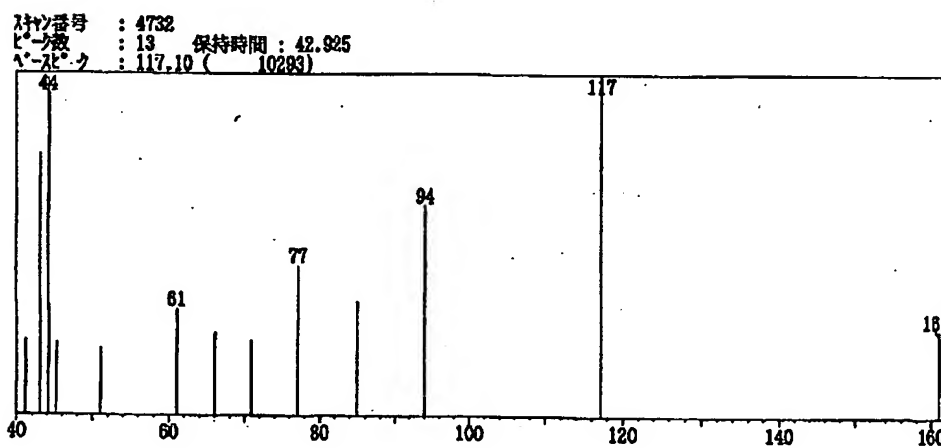


(a)

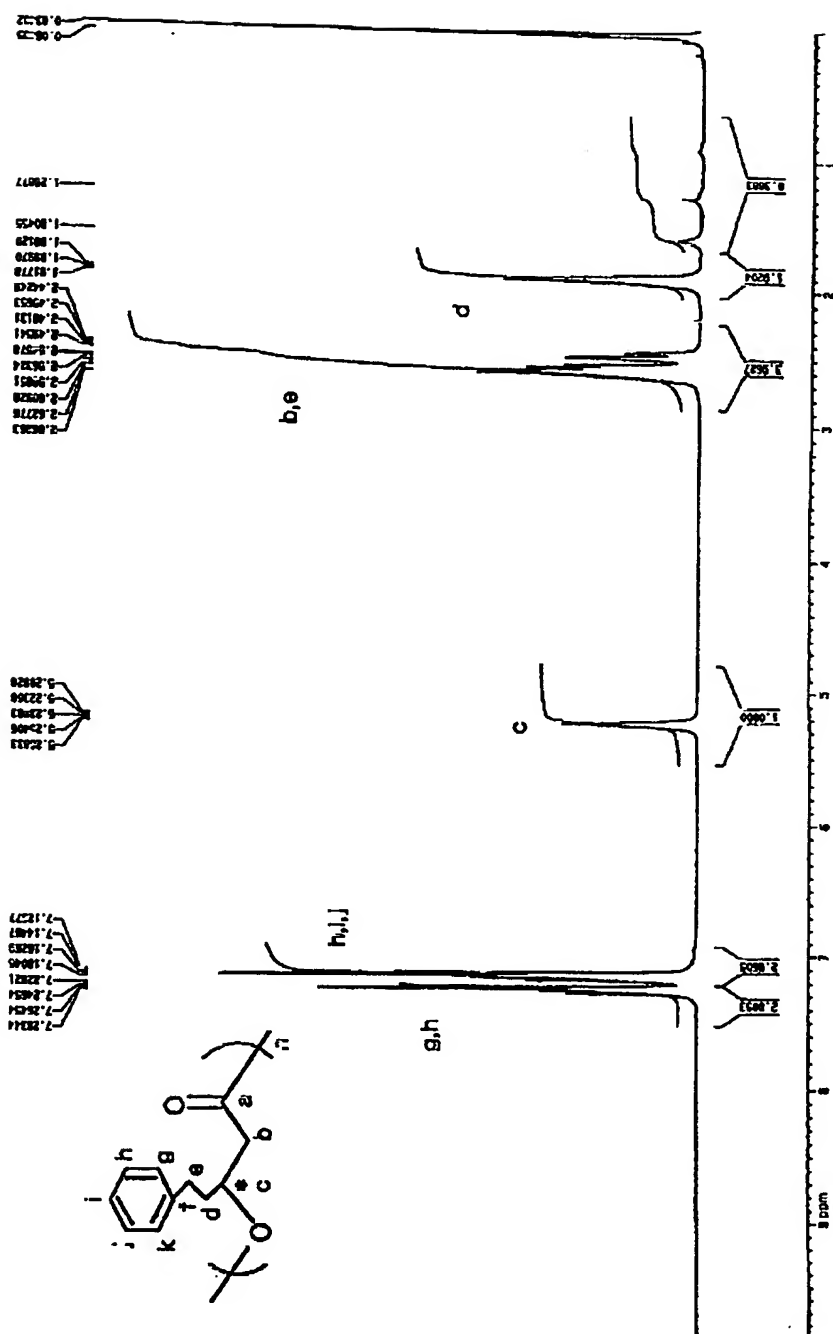


(b)

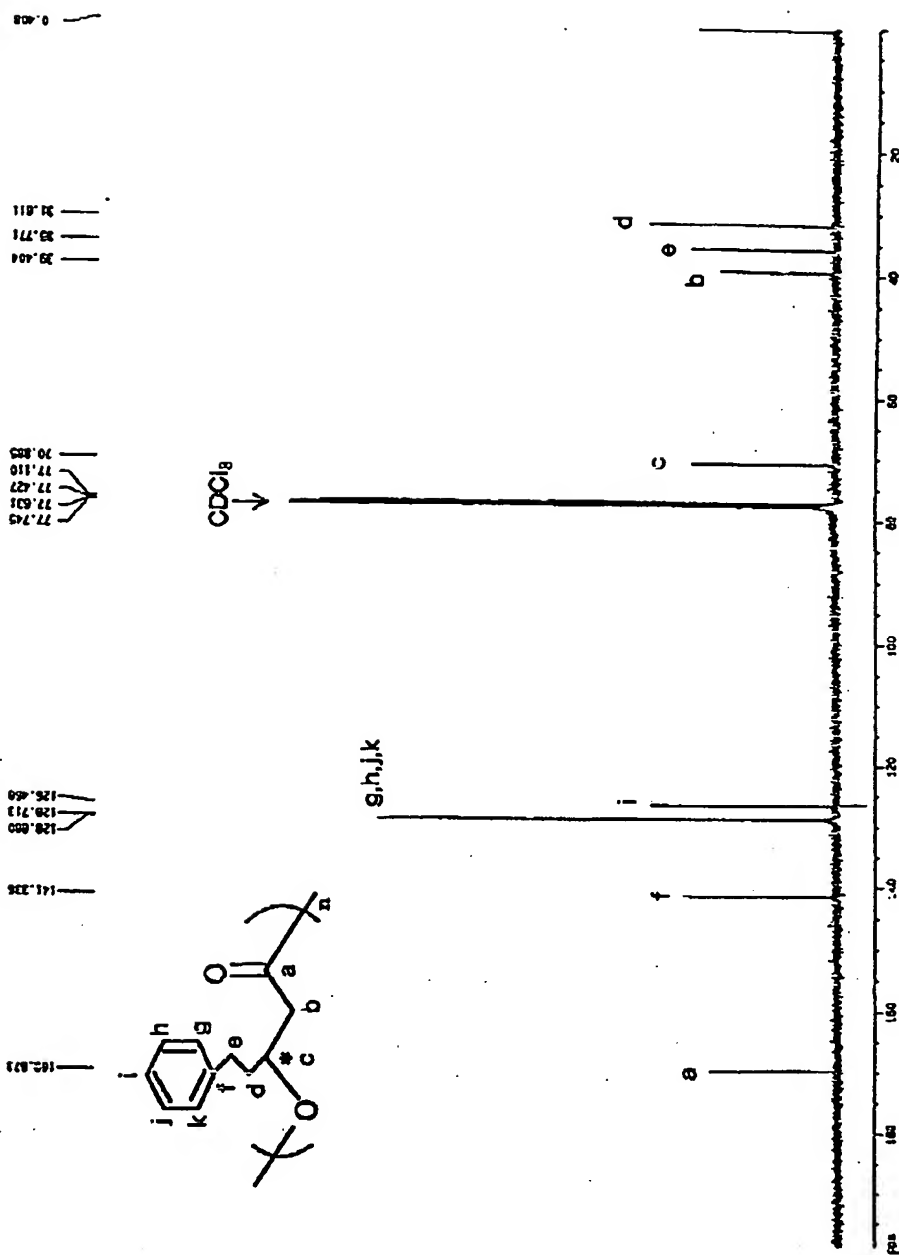
【図22】



【図10】



【11】

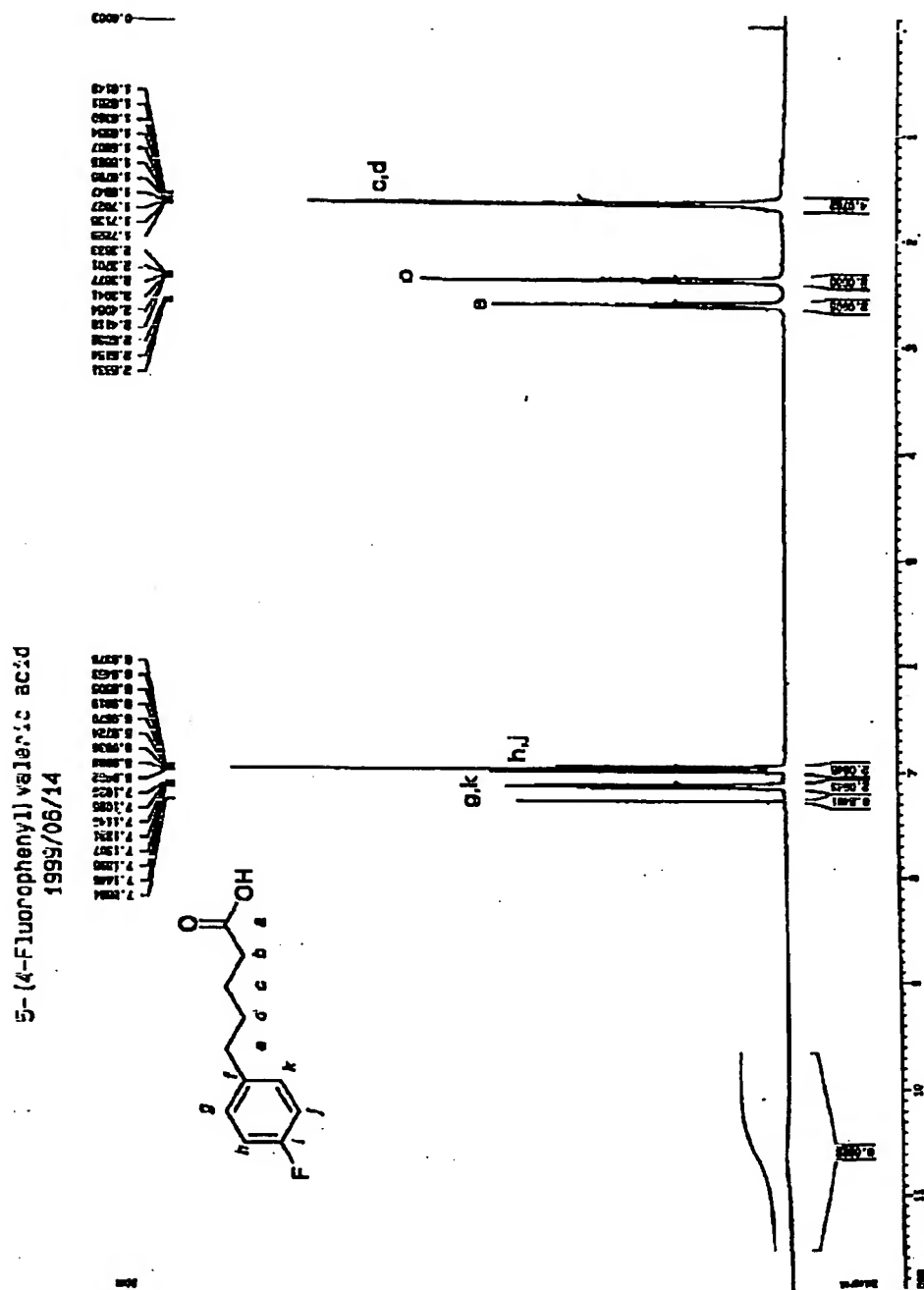


【図12】

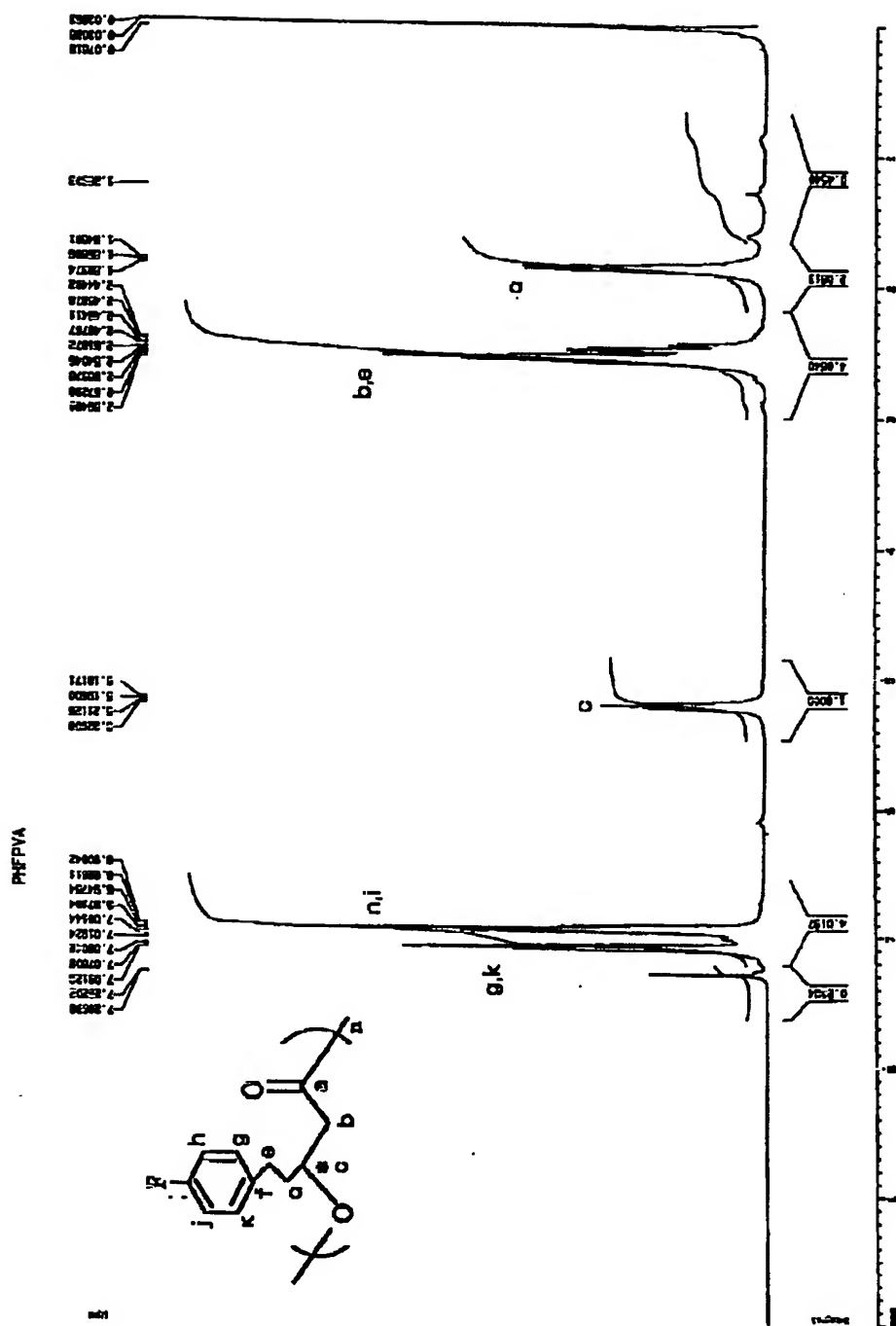
Pseudomonas jessenii P161; FERM P-17445 の16S rRNA配列

TGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTC
CTGAATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGAC
AACGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCT
TCGGGCCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGC/AGTTGGTGAGGTAATGC
CTCACCAAGGCGACCATCCG/AACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTG
AGACACGGTCCAGACTCCTACGCGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATTGGCGAA
AGCCTGATCCACCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAA
GTTGGGAGGAAGGGCATTAACTTAA/ACGTTAGTGTGTTTACGTTACCGACAGAATAAG
CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGG
GCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGCTGGA
ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGCAAGGAACACCAGTGGCGAAGCGG
ACCACCTGGACTGA/ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCT
TAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGCGGAGTACGGCCCCAAGGTTAAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
CAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCT/GACATCCAATGAACTT/CCAGAGATGGATGGGT
GCCTTCCGGAACATTGAGACAGGTCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGAT
GTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC/TTGTCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGT
GGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
TCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGT
TGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTC
TGCAAC/CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCCAATCAGAATGTGCGCGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGT/CCACC
AGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCACTGAGTGGG
GTGAAGTCG/ACCAAGCTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCAC

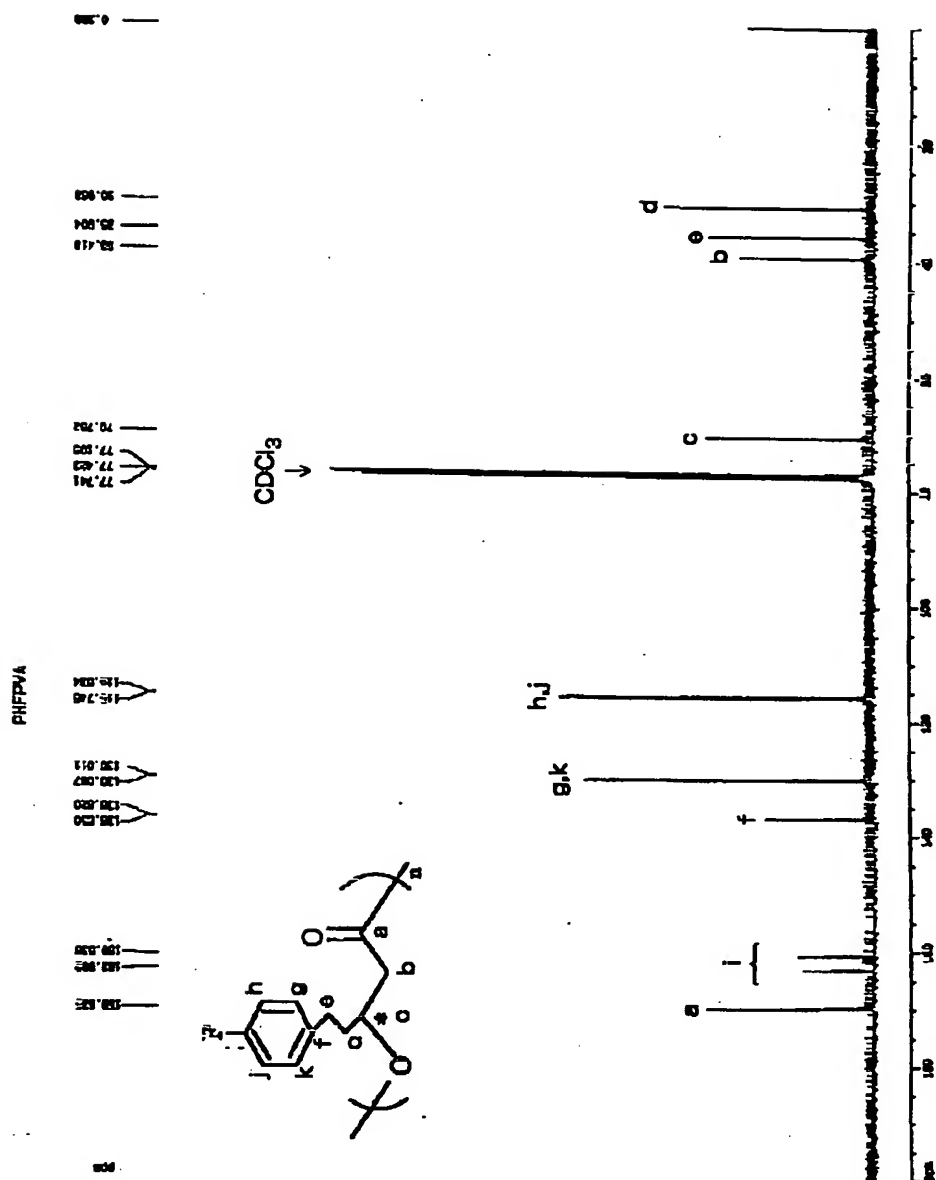
【図13】



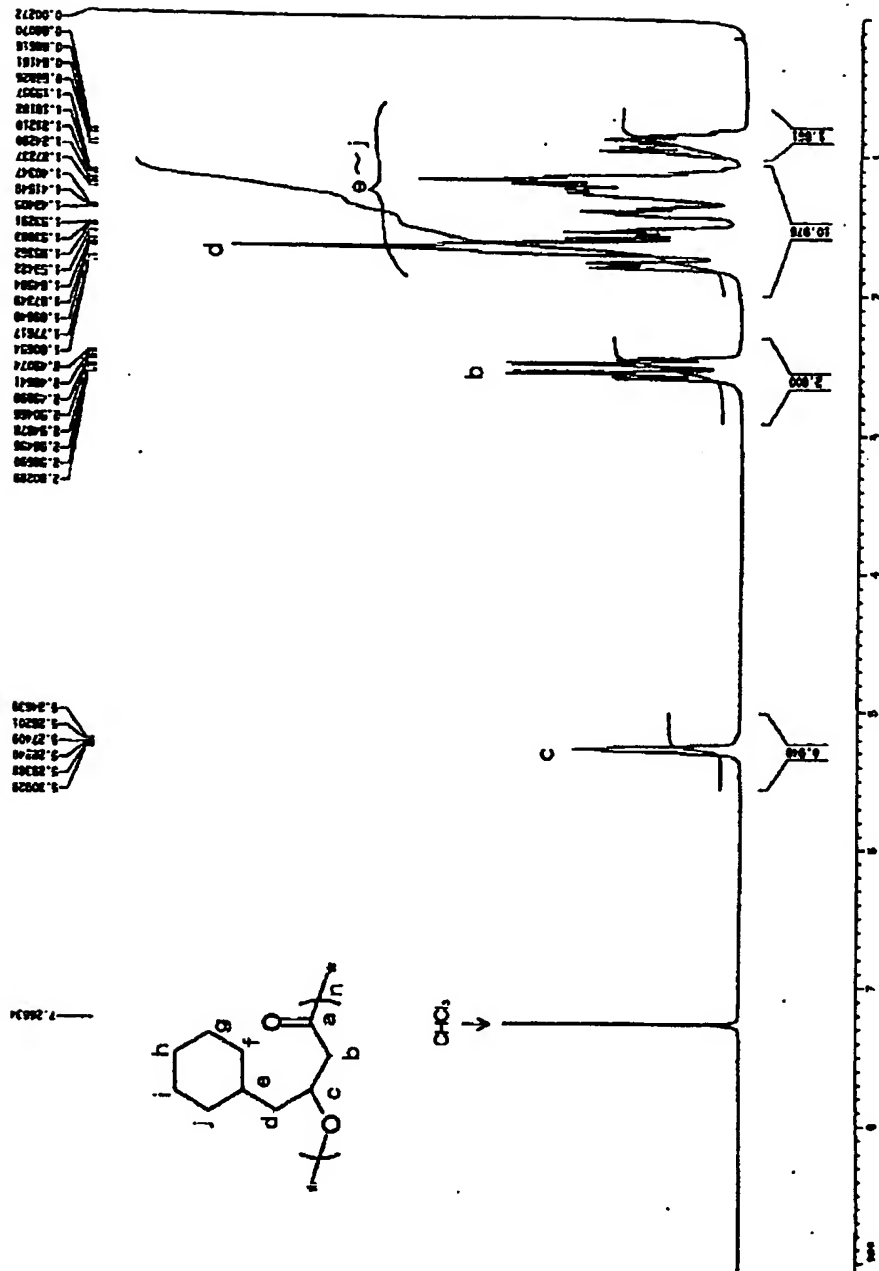
【図14】



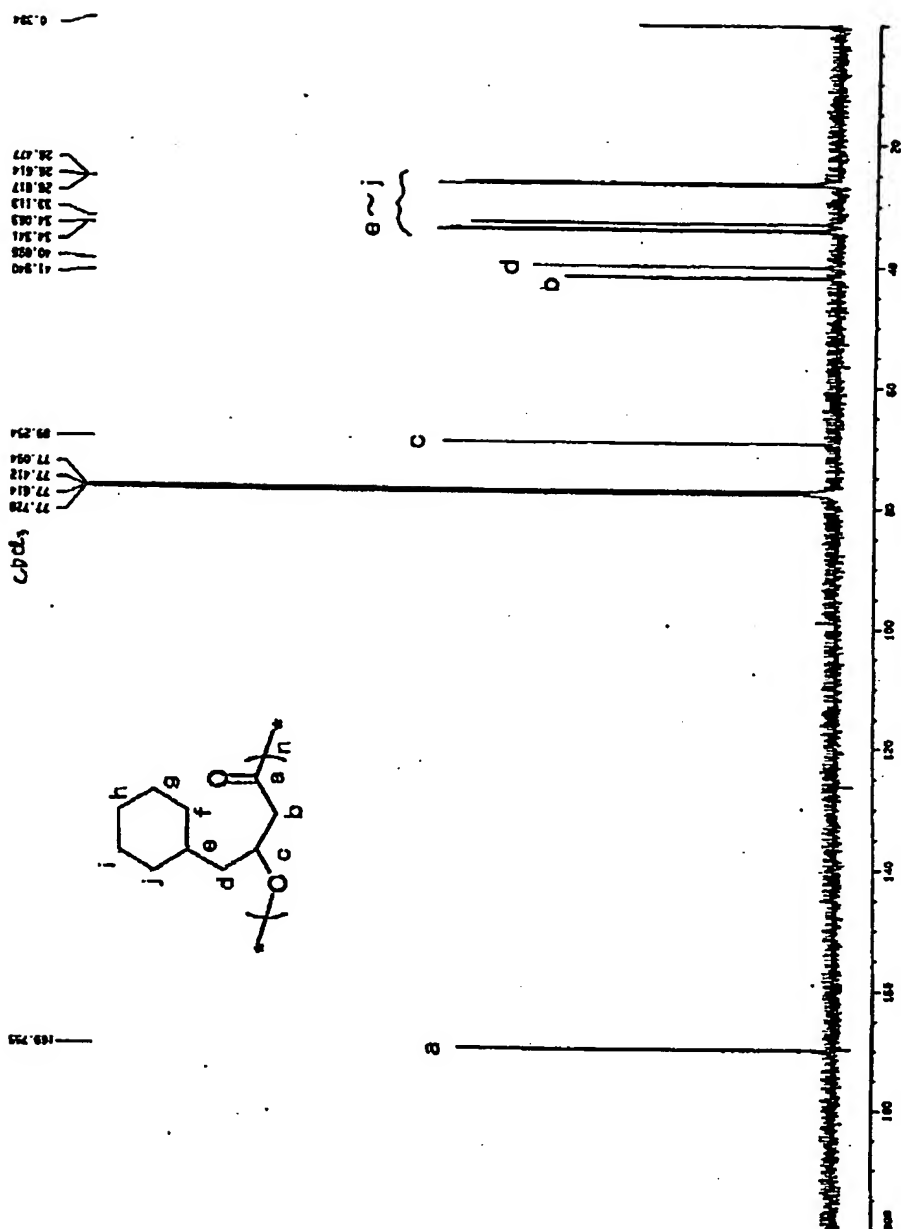
【図15】



【图 16】

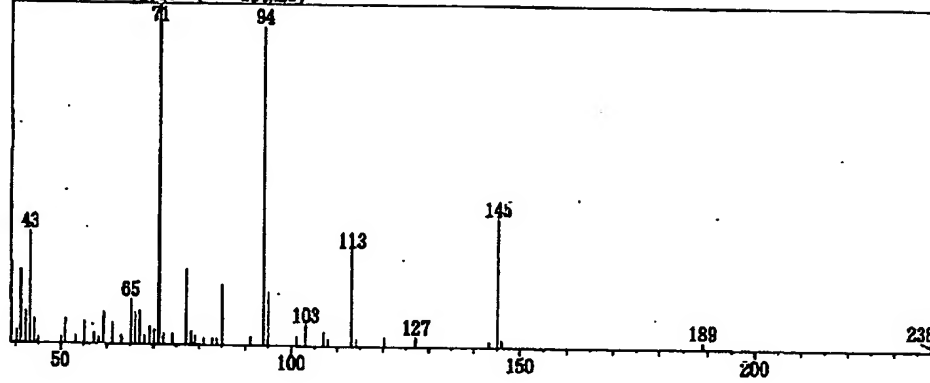


【図17】



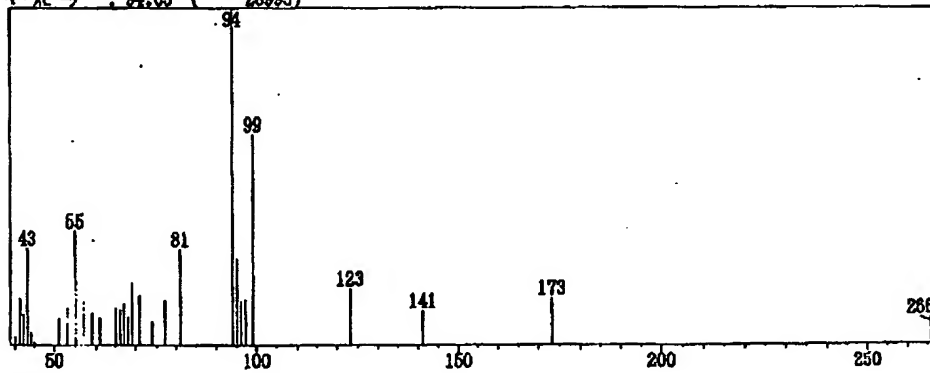
【図23】

サンプル番号 : 7396 分子量範囲 : (6972 - 7878)
ピーク数 : 47 保持時間 : 65.125
ピーク位置 : 71.10 (14223)



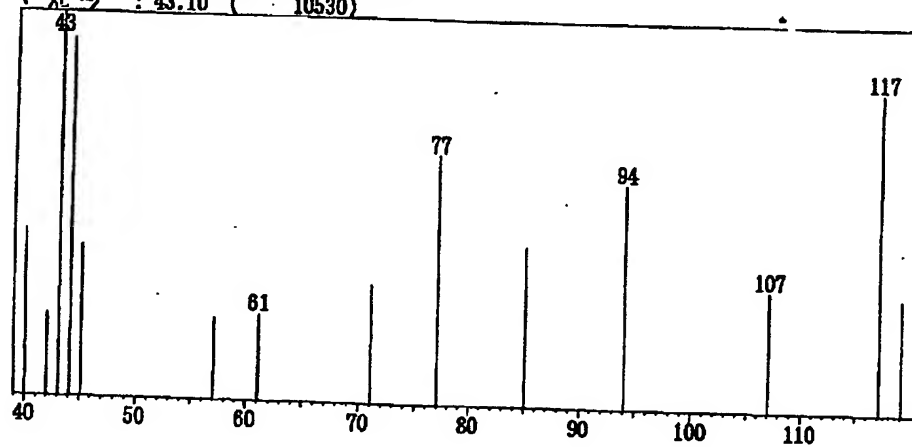
【図24】

サンプル番号 : 11826 分子量範囲 : (11180 - 12354)
ピーク数 : 30 保持時間 : 102.042
ピーク位置 : 84.05 (28995)



【図25】

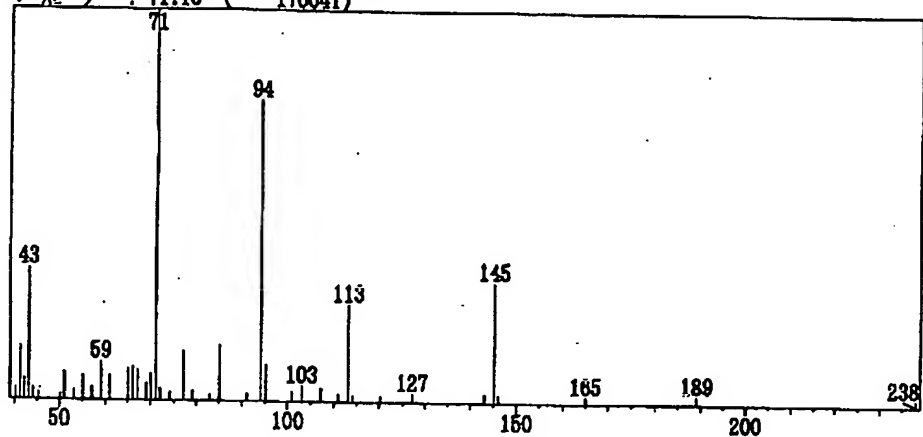
サンプル番号 : 4732
ピーク数 : 14 保持時間 : 42.925
ピーク位置 : 43.10 (10530)



(75) 01-288256 (P2001-288256A)

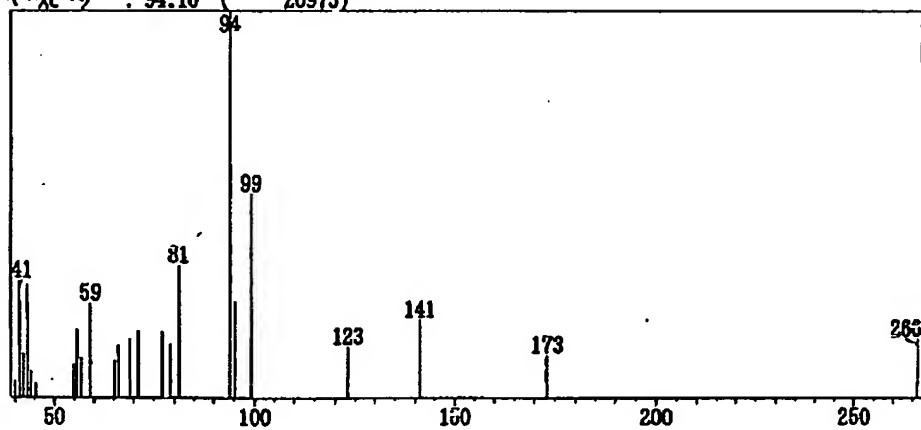
【図26】

スキャン番号 : 7400 パックカウント : (5837 - 8167)
ピーク数 : 42 保持時間 : 85.158
ピーク位置 : 71.10 (170041)



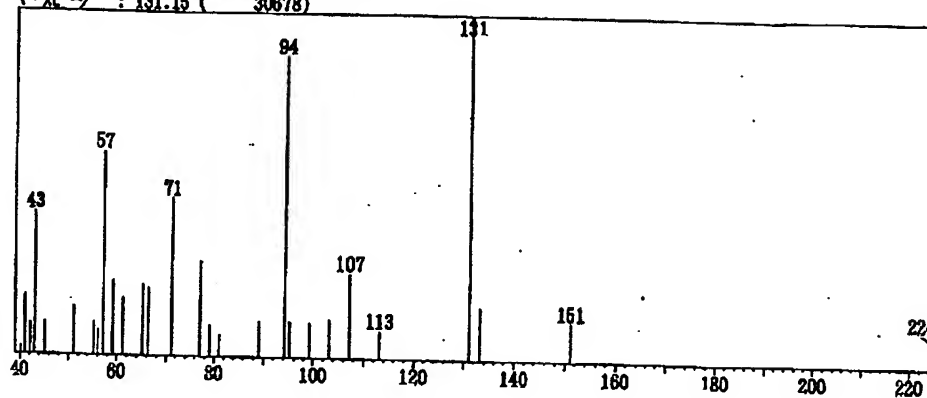
【図27】

スキャン番号 : 11816 パックカウント : (11628 - 11878)
ピーク数 : 24 保持時間 : 101.958
ピーク位置 : 94.10 (20975)



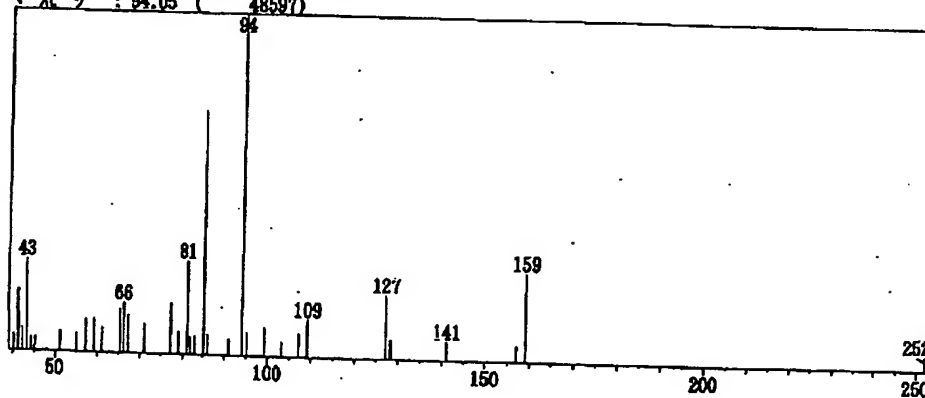
【図28】

サンプル番号 : 5787 マッパグラウト : (5691 - 5868)
ピーク数 : 29 保持時間 : 51.717
ベースピーク : 131.15 (30678)



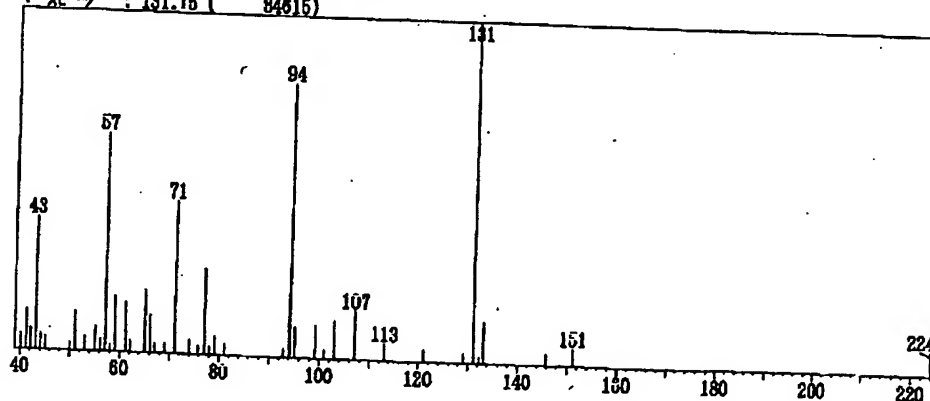
【図29】

サンプル番号 : 8334 マッパグラウト : (9108 - 9553)
ピーク数 : 36 保持時間 : 81.275
ベースピーク : 84.05 (48597)



【図31】

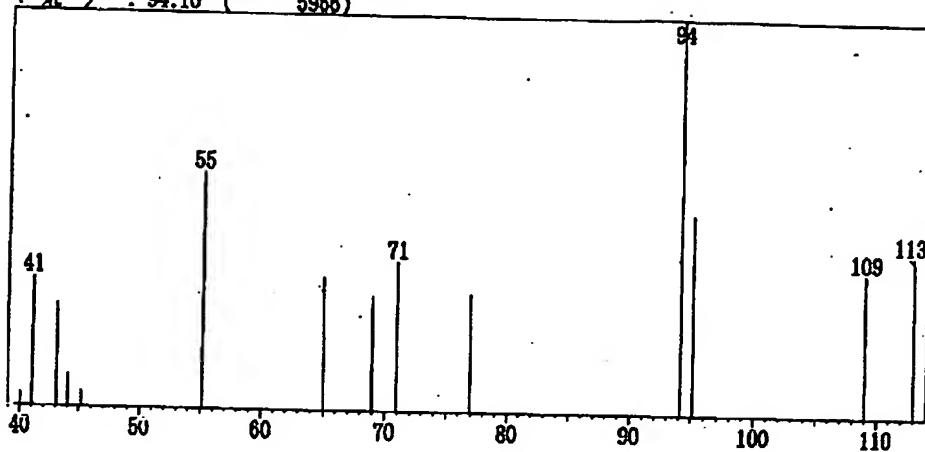
サンプル番号 : 5774 マッパグラウト : (5647 - 5930)
ピーク数 : 43 保持時間 : 51.608
ベースピーク : 131.15 (84615)



(77) 01-288256 (P2001-288256A)

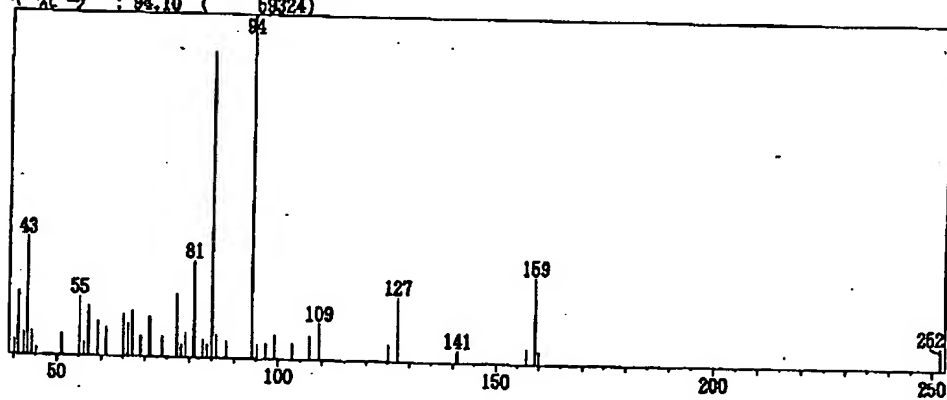
【図30】

サンプル番号 : 15229 バックグラウンド : (15043 - 15439)
ピーク数 : 14 保持時間 : 130.400
ピーク : 94.10 (5988)



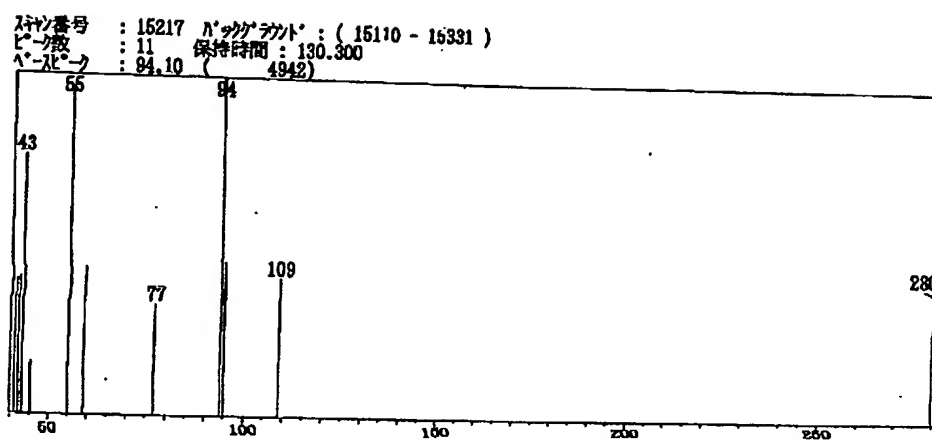
【図32】

サンプル番号 : 9318 バックグラウンド : (9082 - 9893)
ピーク数 : 41 保持時間 : 81.142
ピーク : 94.10 (59324)

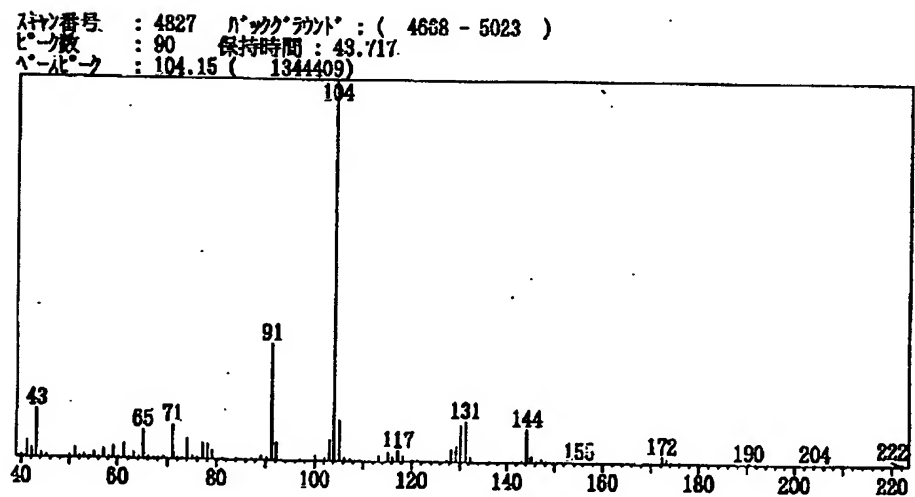


(78) 01-288256 (P2001-288256A)

【図33】

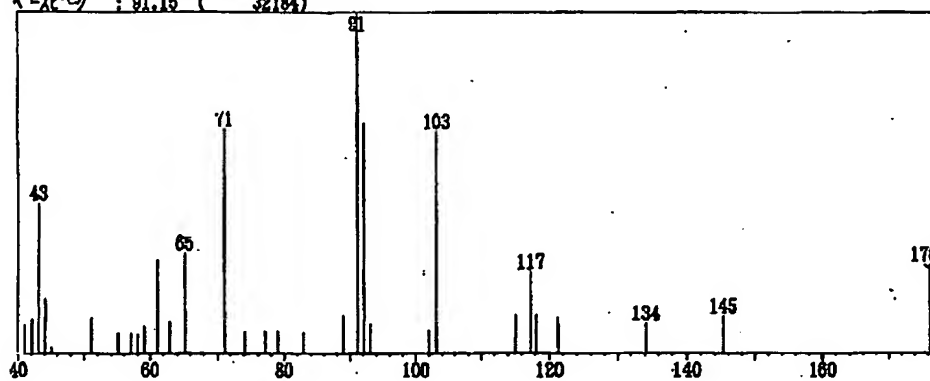


【図34】



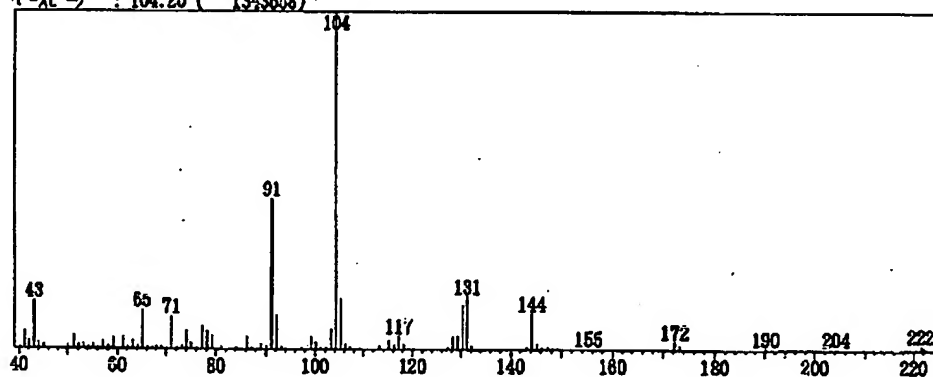
【図35】

ピーク番号 : 3555 パックラクト : (3537 - 3574)
 ピーク数 : 31 保持時間 : 33.125
 ベースピーク : 91.15 (32184)



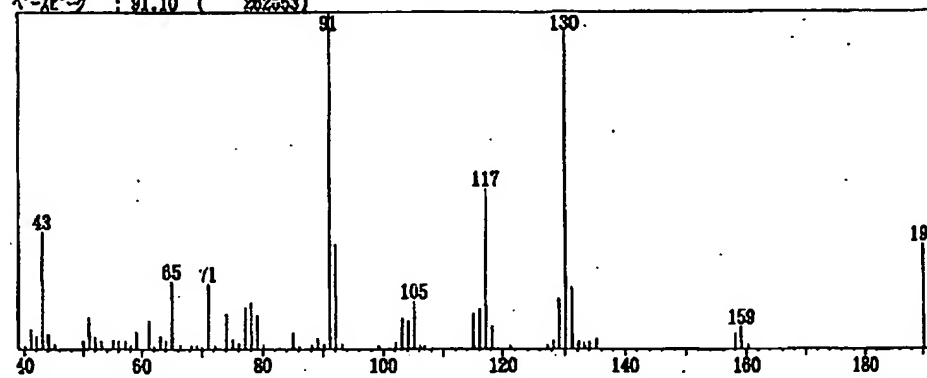
【図36】

ピーク番号 : 4824 パックラクト : (4813 - 5115)
 ピーク数 : 90 保持時間 : 49.692
 ベースピーク : 104.20 (1343658)



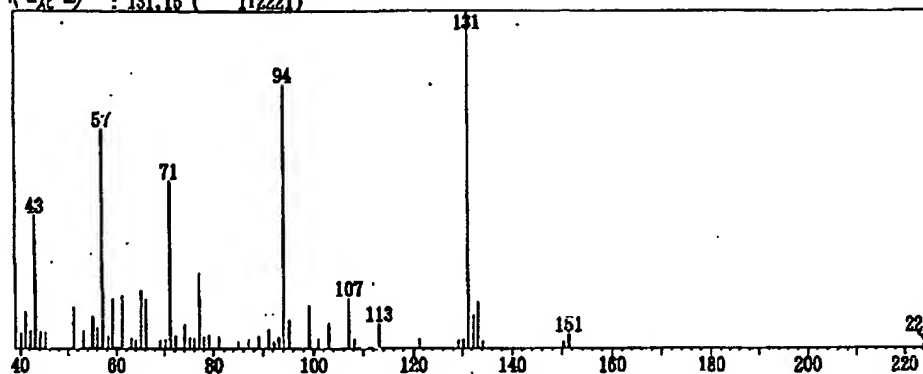
【図37】

ピーク番号 : 4142 パックラクト : (4102 - 4184)
 ピーク数 : 68 保持時間 : 38.008
 ベースピーク : 91.10 (282553)



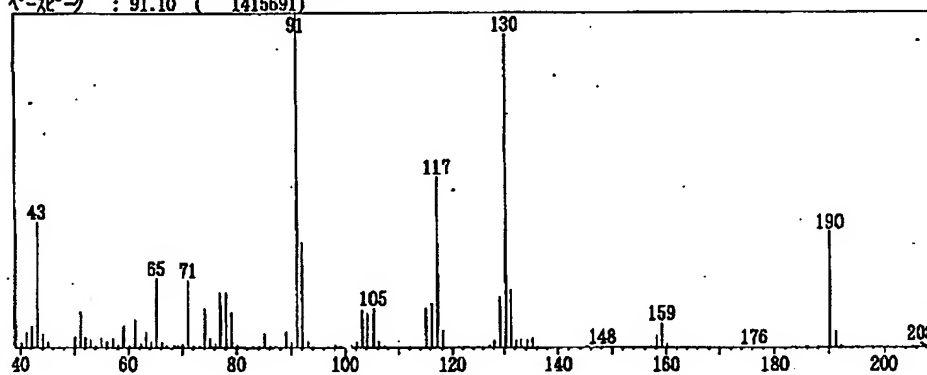
【図38】

スキャン番号 : 5779 マッパケラウト : (5602 - 5982)
ピーク数 : 54 保持時間 : 51.650
ベースピーク : 131.15 (12221)



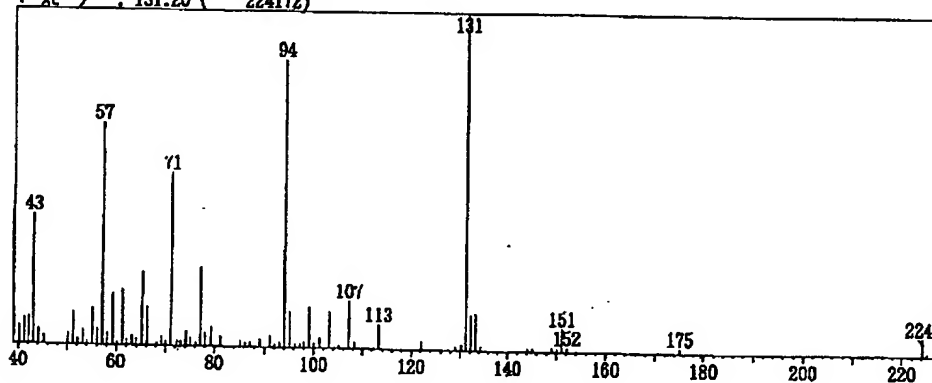
【図39】

スキャン番号 : 4141 マッパケラウト : (3996 - 4283)
ピーク数 : 90 保持時間 : 38.000
ベースピーク : 91.10 (141569)



【図40】

スキャン番号 : 5775 マッパケラウト : (5579 - 5930)
ピーク数 : 73 保持時間 : 51.617
ベースピーク : 131.20 (224172)



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	(参考)
(C 1 2 N 1/20		(C 1 2 N 1/20	D
C 1 2 R 1:40)		C 1 2 R 1:40)	
(C 1 2 P 7/62		(C 1 2 P 7/62	
C 1 2 R 1:38)		C 1 2 R 1:38)	
(C 1 2 P 7/62		(C 1 2 P 7/62	
C 1 2 R 1:40)		C 1 2 R 1:40)	
(31) 優先権主張番号	特願平11-371869	(72) 発明者	須田 栄
(32) 優先日	平成11年12月27日 (1999. 12. 27)		東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		ノン株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2000-23024 (P2000-23024)	(72) 発明者	小林 登代子
(32) 優先日	平成12年1月31日 (2000. 1. 31)		東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		ノン株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2000-23025 (P2000-23025)	(72) 発明者	小林 辰
(32) 優先日	平成12年1月31日 (2000. 1. 31)		東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		ノン株式会社内
(72) 発明者	本間 務	F ターム (参考)	4B064 AD83 CA02 CB24 CC03 CD07
	東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ		CD21 DA01 DA16 DA20
	ノン株式会社内		4B065 AA41X AA44X AC14 AC16
(72) 発明者	見目 敬		BB08 BB29 BD11 BD15 BD16
	東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ		CA12 CA44 CA54 CA60
	ノン株式会社内		4J029 AA02 AB01 AB04 AC01 AD01
			EA02 EA05 EB01 ED03 EE04
			JC771 JD08 JE241

特許庁 平成 11 年 12 月 27 日 特願 11-371869

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

BEST AVAILABLE COPY